



HAL
open science

Comprendre l'agressivité: conséquences comportementales et mécanismes neuronaux régulateurs chez *Drosophila melanogaster*

Antoine Prunier

► **To cite this version:**

Antoine Prunier. Comprendre l'agressivité: conséquences comportementales et mécanismes neuronaux régulateurs chez *Drosophila melanogaster*. Neurosciences. Université de Toulouse, 2024. Français. NNT: 2024TLSES134 . tel-04961752

HAL Id: tel-04961752

<https://theses.hal.science/tel-04961752v1>

Submitted on 22 Feb 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Comprendre l'agressivité :
conséquences comportementales et mécanismes
neuronaux régulateurs chez *Drosophila melanogaster*

Thèse présentée et soutenue, le 24 septembre 2024 par

Antoine PRUNIER

École doctorale

SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries

Spécialité

Ecologie, biodiversité et évolution

Unité de recherche

CRCA - Centre de Recherches sur la Cognition Animale

Thèse dirigée par

Audrey DUSSUTOIR et Séverine TRANNOY

Composition du jury

Mme Maria-Cristina LORENZI, Rapporteuse, Université Sorbonne Paris Nord

M. Serge BIRMAN, Rapporteur, CNRS Paris-Centre

Mme Tihana JOVANIC, Examinatrice, CNRS Île-de-France Gif-sur-Yvette

M. Jean-Marc DEVAUD, Examineur, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Mme Audrey DUSSUTOIR, Directrice de thèse, CNRS Occitanie Ouest

Mme Séverine TRANNOY, Co-directrice de thèse, CNRS Occitanie Ouest

Synthèse grand public

L'éthologie est l'étude des comportements. Vue par le prisme des neurosciences, elle offre de belles opportunités de comprendre nos comportements les plus fondamentaux. Durant ces travaux, nous nous sommes intéressés à l'agressivité. Bien que tabou chez l'être humain, l'agressivité n'en demeure pas moins vitale pour toutes les espèces animales. En effet, elle agit comme un vrai système de communication ritualisé entre les individus d'une même espèce, permettant l'obtention de ressources à un moindre coût énergétique lors de compétitions entre individus. Le comportement agressif est ainsi régulé par la balance des bénéfices attendus et des risques encourus. Par conséquent, contrairement aux idées instinctives, le but de l'agressivité n'est pas de nuire, blesser ou tuer l'adversaire, bien au contraire. Seules les formes intenses ou dérégulées de l'agressivité peuvent aboutir à de tels extrêmes et demeurent exceptionnelles (quand la valeur du bénéfice excède le coût d'une blessure voire d'une mort) ou pathologiques.

Toutefois, une interaction agressive n'est pas un acte anodin et a des conséquences sur l'individu. En effet, bien que l'agressivité soit un comportement inné et observable sans apprentissage préalable, l'expérience de combats des individus leur permet d'apprendre et d'adapter leur comportement agressif ultérieur. Ainsi, un gagnant aura tendance à se montrer plus agressif lors de ses futurs combats, augmentant ses chances de victoire, et à l'inverse un perdant aura tendance à se montrer prudent, réduisant ses chances de réussite : ces effets sont appelés « Effet Winner » et « Effet Loser ».

Dans un premier temps, nous avons voulu comprendre si les effets Winner/Loser ont des effets plus étendus que sur les seuls comportements agressifs. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé comme animal modèle les drosophiles. Dans le cadre de ces études, elles possèdent plusieurs avantages : 1) un panel d'outils génétiques permettant des modifications précises du fonctionnement de leur système nerveux afin d'en étudier leurs conséquences sur le comportement, 2) un faible coût d'entretien et une vitesse de génération rapide, 3) les mâles en particulier sont capables de montrer plusieurs intensités de comportements agressifs (menaces, des attaques, et phénomènes très agressifs appelés « Boxe »), et 4) elles exploitent des indices chimiques, des phéromones, pour communiquer. Expérimentalement, nous avons fait combattre dans un premier temps deux drosophiles mâles avant d'étudier leurs comportements reproducteurs seul ou en compétition dans un second temps. Nous avons montré que les perdants, seuls, montrent moins de motivations mais ont des

comportements reproducteurs comparables aux gagnants. En revanche en compétition, les perdants montrent des comportements de cour moins performants à l'avantage des gagnants. Nous avons également montré que les femelles n'ont pas de préférence spontanée pour les gagnants ou les perdants sur la seule base des indices chimiques donnés par les mâles. De ces résultats, nous concluons que l'effet loser dépend avant tout de l'interaction entre mâles plus que du loser en lui-même ou des femelles. Nous ouvrons la question sur les conséquences de ces expériences agressives pour les individus dont l'agressivité serait dérégulée.

Pour pouvoir répondre à cette question, il nous fallait d'abord comprendre comment l'agressivité fonctionne dans le cerveau de la drosophile. Plusieurs études se sont emparées du sujet, mettant notamment en cause l'octopamine, un neurotransmetteur comparable à la noradrénaline chez les vertébrés. En l'occurrence, une diminution de la transmission de l'octopamine engendrait des diminutions du comportement agressif. Très récemment, il a été découvert que les neurones de la drosophile connus pour utiliser l'octopamine comme neurotransmetteur sont capables d'en utiliser un second : le glutamate. Ce phénomène de double neurotransmission n'a jamais été étudié dans le cadre de l'agressivité. Nous avons voulu étudier ce phénomène en nous basant sur des neurones clairement identifiés comme étant capables de double neurotransmission : les VPM4. En augmentant l'activité de ces neurones, nous avons constaté une dérégulation de l'agressivité qui se traduisait par des événements de boxe. Nous avons ensuite identifié que seul l'augmentation de la transmission du glutamate recapitulait ces observations, ce qui suggère deux rôles bien distincts pour l'octopamine et le glutamate. Nous avons par la suite voulu connaître le partenaire neuronal sur lequel les VPM4 agissent pour déréguler l'agressivité. Sur la base des connaissances en connectomiques, l'étude des connexions neuronales, nous avons identifié le MBON-11 comme l'un d'eux. Le MBON-11 est un neurone inhibiteur utilisant le GABA comme neurotransmetteur inhibiteur. Il s'agit aussi de neurones de sortie des corps pédonculés, une structure centrale dans le cerveau des insectes sous-tendant leur mémoire et leurs comportements. Leur rôle est ainsi de relayer l'information des corps pédonculés au reste du cerveau. En augmentant l'activité du MBON-11, nous dérégulons de la même façon qu'avec le VPM4 l'agressivité. Nous avons montré que la communication entre les deux neurones se faisait par le biais du récepteur $\text{GluCl}\alpha$, un récepteur au glutamate capable d'inhiber les neurones. De plus, nous avons montré que le GABA des MBON-11 était bien responsable de la dérégulation de l'agressivité. Nous avons ainsi pu aboutir à un modèle explicatif mettant en relation ces deux neurones dans la régulation de

l'agressivité, dans lequel l'activité régulée du MBON-11 est nécessaire pour permettre aux drosophiles d'adopter un comportement agressif normal.

En approfondissant nos connaissances sur l'agressivité des drosophiles, nous pourrions en apprendre davantage sur les comportements agressifs d'autres espèces et l'humain notamment. Nous partageons avec la drosophile de nombreux points communs tant du point de vue biologique (nous partageons bons nombres de neurotransmetteurs) que génétique (environ 70% des gènes humains impliqués dans des pathologies ont des analogues chez la drosophile). Nous pourrions également mieux comprendre comment fonctionne en général l'agressivité au sein du règne animal, comprendre sa régulation et ses facteurs de risques capables de la déréguler. Ce faisant, nous pourrions prévenir les situations d'agression dérégulée, ses risques et ses conséquences pour les individus.

Synthesis for general public

Ethology is the science of behaviours. Through the prism of neuroscience, it offers great opportunities to understand our very fundamental behaviours. Through this work, we were interested in aggressiveness. Aggression may be taboo for humans, but it is nonetheless vital for all animal species. Indeed, it is a true system of ritualized communication between individuals from the same species, allowing the claim of resources with the most minimal energetical cost during the competition. Aggressive behaviour is thus regulated by the balance between expected benefits and potential risks. Consequently, contrary to the spontaneous conception, the aim of aggression is not to harm or kill. Only the most intense or dysregulated forms of aggressiveness can lead to such consequences, and these remain exceptional (when benefit value exceed the risk of harm or death for instance) or pathological.

However, aggressive interactions are not small thing and have consequences on individuals' behaviours. Indeed, even though aggressiveness is innate and can be observed without any previous learning, fights' experiences allow individuals to learn and adapt their future aggressive behaviours. Thus, a winner would be more aggressive and thus increase its chances to win, on the opposite a loser would be more careful, leading in a decrease of their chances of success. These effects are called Winner and Loser effects.

As a first step, we wanted to understand if Winner and Loser effects can have a larger impact on behaviours than just limited to aggressive ones. To tackle this question, we used *Drosophila* as an animal model. For our research, *Drosophila* show several advantages : 1) a wide panel of genetic tools available to modify the functioning of central nervous system and see the consequences on behaviour, 2) it is low cost to manage and quickly rise new generations, 3) males in particular are able to display different intensities of aggression : threats, attacks and higher aggressive phenomenon called "Boxing" and 4) they use chemical cues, pheromons, to communicate. Experimentally, a fight between two males was organized before testing their reproductive behaviours either alone or in competition with another male. We showed that alone, losers are less motivated to court but they have reproductive behaviours comparable to winners otherwise. In competition however, losers showed impaired reproductive behaviours. We also showed that females do not have spontaneous preference for winners or losers when the choice is only based on chemical cues from males. As a conclusion, we propose that loser effect relies mostly on the interaction between males rather than the losers itself or the females.

We ask the question of the consequences of such aggressive experience for individuals showing dysregulated aggressive behaviours.

To answer this question, a greater understanding of aggression regulation in *Drosophila*'s brain was required. Several studies contributed to this knowledge and some showed that octopamine, a neurotransmitter comparable to norepinephrine in vertebrates, is involved. Actually, a diminution of octopaminergic transmission leads to a diminution of aggression. Very recently, it has been shown that a majority of neurons using octopamine as a neurotransmitter are able to use a second one: glutamate. This dual-transmission phenomenon has not been studied in aggression yet. We wanted to study this process in this context by studying one of these dual-transmitting neurons which has been clearly identified: the VPM4. By increasing its activity, we observed dysregulated aggressive behaviours such as boxing. We then discovered that only an increase in glutamate releasing in VPM4 is able to dysregulate aggression, suggesting two distinct roles for octopamine and glutamate in VPM4. We wanted to know the neuronal partner on which VPM4 act to dysregulate aggression. Based on connectomic data, the study of neuronal connexions, we identified MBON-11 as one of these. MBON-11 are inhibitory neurone which uses GABA, an inhibitory neurotransmitter. They are also output neurons of mushroom bodies, a central structure in insects' brain underlying memory and behaviours. The role of MBON-11 is to assure the transmission from mushroom body to other parts of the brain. By increasing MBON-11 activity, we observed the same dysregulated aggressive behaviours as in VPM4 activation. We showed that the communication between VPM4 and MBON-11 is possible thanks to $\text{GluCl}\alpha$, an inhibitory glutamate receptor. Moreover, we showed that GABA in MBON-11 is responsible of the dysregulation of aggression. Thus, we could create a model including both of these neurons to explain how they are involved in the regulation of aggression, in which a regulated MBON-11 activity is core to allow *Drosophila* to have normal aggressive behaviours.

Increase our knowledge on *Drosophila* aggression could help us to understand our very own human aggressive behaviours. We share many biological (we use the same neurotransmitters) and genetic similarities (up to 60% of our genes involved in pathology find an analogous one in *Drosophila*). We could also understand better how aggression is regulated and the factors of risks that may lead to dysregulated behaviours. Ultimately, we could prevent dysregulated aggression and its consequences to occur for individuals.

Remerciements

Parce qu'une thèse c'est avant tout un travail d'équipe, je tiens à remercier chaque personne sans qui il n'y aurait pas eu cette thèse.

Je pense que les premiers remerciements doivent aller à **Séverine Trannoy** et **Audrey Dussutour**, mes directrices de thèse. Sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse. En particulier Séverine, merci pour ta transparence et ton encadrement. Bien sûr, des périodes difficiles il y en a eu, mais je retiendrai surtout qu'il y a toujours eu suffisamment de communication pour mener la barque jusqu'au bout. Nous pouvons le dire : ça y est ! On l'a fait ! Cela a été un plaisir et un honneur d'être ton premier doctorant, et nous aurons je pense beaucoup appris l'un de l'autre, sur l'un et sur l'autre, et surtout sur nous-mêmes. Je ne m'inquiète pas pour tes prochains doctorants qui auront la chance de t'avoir comme encadrante.

Je souhaiterais remercier les membres du jury qui ont évalué l'ensemble de ce travail. Les personnes en charge des rapports, **Pr Maria-Cristina Lorenzi** et **Dr Serge Birman** et les examinateurs et examinatrices **Dr Tihana Jovanic** et **Pr Jean-Marc Devaud**. Merci pour vos rapports et discussions bienveillants qui ont été très stimulantes et m'ont amené à réfléchir sur les concepts employés, les résultats obtenus et leurs significations. Non seulement sans vous il n'y aurait pas eu de thèse, mais vous avez également apporté vos réflexions personnelles qui ont enrichi de manière unique ces travaux, et pour cela je vous remercie encore.

Merci à **Guillaume Isabel** et **Yaël Grosjean**, qui ont accepté de faire partie de mon comité de suivi. Vous avez su apporter vos regards et votre expertise pour guider ce projet de thèse au mieux afin qu'il aboutisse. C'est maintenant chose faite, sans vous il n'y aurait pas eu de thèse.

Je souhaiterais remercier le second doctorant de Séverine, collègue et avant tout ami, **Anthony Defert**. Que dire ? Un enfant doré, vivant pour les caméras et la *fame*, qui sait ramener bonne humeur et gâteaux. Sans toi, il n'y aurait pas eu de thèse. Toujours de bons conseils, prêt à aider, à rigoler. Bref, je suis très heureux de t'avoir eu comme collègue de bureau et de te compter parmi mes amis, même si tu n'as jamais voulu le reconnaître. Arrête de finir tard, nonobstant.

En parlant d'Anthonys, je voudrais remercier **Anthony Roig**. Merci copain. Sans toi, il n'y aurait pas eu de thèse (ni cette anaphore que je t'emprunte). Toujours prêt à m'entendre m'étaler sur comment je me sentais, comment je vivais ma vie. Prêt à parler science (un peu trop) et à aider au niveau statistique dans lequel j'excelle dans la médiocrité. Promis j'y travaille, on se fait une visio au bureau pour en parler si tu veux.

En parlant de bureau, gros cœur sur les **bureaux 4001** (IVEP ♥) et **4054** (Explain ♥). Merci à toutes les âmes qui y sont passées : **Alex** pour ton flegme et ta passion pour l'éthologie et l'imagerie, **Ana** pour tes BeReal, **Aurèle** pour tes conseils, **Tom** pour nos discussions autour de l'esprit critique, **Samantha** pour nos petites sessions IA et ta bonne humeur, et les stagiaires avec qui on a bien rigolé : **Maxime**, **Sophia**, **Pauline 1** et **Pauline 2**, **Emilie**, **Léa**... Sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

Je souhaiterai remercier les équipes **IVEP** et **Explain** avec lesquelles j'ai partagé cette aventure. Merci à tous les chercheurs, doctorants et étudiants des équipes avec qui il est toujours agréable de parler science et d'écouter les riches expériences de chacun. Sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

Un remerciement particulier aux stagiaires qui ont participé aux travaux de thèse, notamment **Mariana, Yasmine, Kamilla** et **Tom**. Merci d'avoir contribué au scoring, lavage et remplissage de Tubz. Mariana, merci quand même pour ta bière à l'eau de mer. Ce n'était pas super bon, mais la tentative d'ouverture propre qui a lamentablement échoué et qui a apporté au bureau 4001 l'écume de Bretagne restera dans nos mémoires et sur nos ex-bureaux.

Un remerciement particulier et spécial à **Claire Rampon** et **Raphaël Jeanson**, la direction du CRCA. Je trouve que vous avez su trouver les mots justes quand il le fallait, et être d'excellents interlocuteurs dans les moments difficiles. Vous saviez mettre en évidence les faits et la réalité quand il le fallait, sans jamais la déguiser, en ce qui me concerne. Donc, au-delà de la simple blague de l'anaphore, c'est avec la plus grande sincérité que j'écris : sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

Second merci très spécial : à **Philippe Rousseau**, mon mentor, et au programme mentorat du CBI organisé par **Julie Batut**. Philippe, tu as été d'un soutien vital au cours de cette thèse. Nos discussions m'ont permis d'une part de relativiser, et d'autre part prendre du recul sur comment aborder cette thèse sans lequel j'aurai sûrement fait fausse route ! Je pense que j'ai appris plus sur moi-même à tes côtés plus qu'en toute une vie. Merci d'avoir su te rendre disponible, quand bien même je ne peux qu'imaginer comment ce n'était pas simple pour toi. Sans toi il n'y aurait pas eu de thèse. Vraiment, merci.

D'ordre plus personnel, merci à **Aloyse** qui m'accompagne depuis plus de 8 ans contre vents et marées. Elle qui a su rester présente pendant ces 3 ans parfois tumultueux, toujours avec bienveillance, quand j'en avais le plus besoin. Sans toi il n'y aurait pas eu de thèse.

Merci à ma **famille** bien sûr. Malgré la distance, et mes appels (trop) rares, vous avez tâché de me soutenir et de me reconforter dans les moments compliqués. Sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

Merci aux structures et tutelles : le **CRCA-CBI** pour avoir fourni les locaux, le matériel, et de multiples occasions d'étendre ma culture scientifique ces trois dernières années. A l'école doctorale **SEVAB** à qui je souhaite rendre honneur de par l'investissement qu'ils ont vis-à-vis du bien être des doctorants. Je salue toutes les actions et le sérieux que l'ED aura adopté sur ces problématiques. Le **CNRS** et l'**Université Paul Sabatier** pour m'avoir accueilli en tant que doctorant et étudiant. Merci à l'**ANR** d'avoir financé le projet de thèse et de contribuer tous les jours à la recherche en France, en espérant que cela puisse continuer encore longtemps. Sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

A toutes celles et ceux que j'ai oublié : Merci, sans vous, il n'y aurait pas eu de thèse.

C'était une belle aventure.

La fureur des drosophiles, si petite soit-elle, est le miroir de la passion brûlante pour la vie qui anime chaque créature.

Microsoft Copilot Designer

Petites réflexions sur les animaux en recherche

Je souhaite dédier un petit préambule à quelques réflexions que j'ai eues vis-à-vis de ma recherche par rapport au cadre éthique et législatif de la recherche en comportement animal. L'usage des animaux en recherche est strictement régulé et réglementé. Il existe la règle des **3R** développée par Russell et Burch en 1959 qui dit que la recherche doit tendre à **R**éduire le nombre d'animaux utilisés, **R**emplacer les animaux par des alternatives (*i.e.* sur des élevages de cellules d'organes) et **R**affiner la méthodologie pour réduire l'intensité et la quantité de toutes formes de souffrance tant physique que mentale (Russell & Burch, 1959). Aujourd'hui, la façon de faire pour suivre et définir ces 3R reste sujet à débat (Tannenbaum & Bennett, 2015). Si nous prenons le cas de l'usage des invertébrés, il s'agit pour certains organismes de respecter le Remplacement. Ce flou est aussi présent d'un point de vue législatif. La directive 2010/63/UE du parlement européen et du conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques impose la conduite à respecter en recherche pour tous les vertébrés et céphalopodes. Elle vise à termes la disparition de tout usage animal dans la recherche. Toutefois, aucune mention n'est faite des drosophiles ou des invertébrés en général. La seule mention du mot insecte est relative à la protection des vertébrés face à leur invasion pour préserver leur bien-être. Le rapport de la commission au parlement européen et au conseil sur la mise en œuvre de cette directive pointe qu'en 2017, plus de 12.5 millions d'animaux ont été mis à mort au nom de la recherche. 83% sont des souris et 7% des poissons zèbres, mais aucune information sur les invertébrés ou les insectes. Il n'est pas clair au regard de la loi si les invertébrés devraient être traités comme des animaux vertébrés, au-delà des céphalopodes. A décharge, la considération du bien-être des invertébrés en dehors des céphalopodes est assez nouvelle et encore limitée aujourd'hui y compris pour la recherche elle-même (Cooper, 2011; Keller, 2017; Lewbart & Zachariah, 2023). Cette question a son importance car elle pourrait drastiquement changer les pratiques. A titre d'exemple, au cours de cette thèse, une estimation basse du nombre de compétitions organisées tourne autour de 2220, soit 4440 drosophiles utilisées sur trois ans. Je n'aurai pas la prétention de trancher la question qui pour le moment relève plus de la conviction personnelle que du consensus. Il me semble néanmoins nécessaire de garder cette question en tête afin de questionner notre pratique et notre relation à nos objets d'études et de recherche. Ne nous voilons pas la face, et soyons simplement franc envers nos convictions et honnêtes envers nous-mêmes !

TABLE DES ABREVIATIONS	1
INDEX DES FIGURES	4
INDEX DES TABLEAUX	5
INTRODUCTION	6
1. DEFINITIONS DES CONCEPTS	7
1.1. ETUDE DES COMPORTEMENTS & COMPORTEMENTS SOCIAUX	7
1.2. AGRESSIVITE ET FONCTIONS	8
1.3. DEFINIR UNE AGRESSIVITE DEREGULEE	10
1.4. DEFINIR LA REPRODUCTION	12
2. EXPRESSIONS ET INFLUENCES	14
2.1. LES COMPORTEMENTS AGRESSIFS	14
2.1.1. STRATEGIES COMPORTEMENTALES	14
2.1.2. INFLUENCES ENVIRONNEMENTALES ET ECOLOGIQUES	17
2.1.3. CAUSES ET CONSEQUENCES DE L'EXISTENCE DE L'HYPER AGRESSIVITE	19
2.2. LES COMPORTEMENTS DE COUR	20
2.2.1. STRATEGIES COMPORTEMENTALES	20
2.2.2. INFLUENCES ENVIRONNEMENTALES ET ECOLOGIQUES	21
2.3. LES EFFETS WINNER ET LOSER	22
3. LE MODELE DROSOPHILE : INTERETS ET ETAT DE L'ART	23
3.1. QUELQUES GENERALITES	23
3.2. LES OUTILS GENETIQUES	26
3.2.1. LE COMPLEXE BIPARTITE UAS/GAL4 ET SES VARIANTES	26
3.2.2. L'ACTIVATION ET L'INACTIVATION INDUITE DU NEURONE : DTRPA1 ET SHIBIRE ^{TS}	29
3.2.3. LA MODULATION D'EXPRESSION GENIQUES : LES ARN INTERFERENTS ET LES SEQUENCES CODANTES	30
3.3. LES COMPORTEMENTS DE LA DROSOPHILE	30
3.3.1. LES COMPORTEMENTS AGRESSIFS	31
3.3.2. LES COMPORTEMENTS REPRODUCTEURS	36
3.4. LES PHEROMONES, PRINCIPAL SYSTEME DE COMMUNICATION...	38
3.4.1. ...DE L'AGRESSIVITE : LES CAS DU 7-T ET DU CVA	38
3.4.2. ...DE LA REPRODUCTION : DES INHIBITEURS ET DES PROMOTEURS	39
3.4.3. INTEGRATION DES SIGNAUX	40
3.5. NEUROTRANSMISSION ET CIRCUITS DES COMPORTEMENTS SOCIAUX	43
3.5.1. LA SEROTONINE	43
3.5.2. LA DOPAMINE	44
3.5.3. LE GABA	45
3.5.4. L'OCTOPAMINE, LE GLUTAMATE ET L'HYPOTHESE DE LA DOUBLE TRANSMISSION	47
3.5.5. LES CIRCUITS NEURONAUX DES COMPORTEMENTS SOCIAUX DES MALES	51
3.5.6. LES CORPS PEDONCULES	55

PROBLEMATIQUE DE LA THESE	61
OBJECTIF 1 : L'ADAPTABILITE SOCIALE – CONSEQUENCES DE L'AGRESSIVITE SUR LA REPRODUCTION	61
OBJECTIF 2 : MECANISMES NEURONAUX DE REGULATION DU COMPORTEMENT AGRESSIF	62
MATÉRIELS & MÉTHODES	63
3.6. ELEVAGE DES DROSOPHILES	64
3.7. LIGNEES UTILISEES	64
3.8. TESTS COMPORTEMENTAUX D'AGRESSIVITE	66
3.9. EVALUATION DU COMPORTEMENT REPRODUCTEUR	67
RÉSULTATS	68
1. CONSEQUENCES D'UN COMBAT SUR LA REPRODUCTION	69
1.1. INTRODUCTION	69
1.2. ARTICLE PLOS ONE : PRUNIER & TRANNOY, 2024	70
1.3. DISCUSSION	92
2. MECANISMES NEURONAUX DE REGULATION DU COMPORTEMENT AGRESSIF	94
2.1. INTRODUCTION	94
2.2. ARTICLE EN PREPARATION : PRUNIER, SHERER, DA SILVA, BIHL, CERTEL & TRANNOY	96
2.3. DISCUSSION	129
DISCUSSION GÉNÉRALE	132
1. EXPLIQUER LES CONSEQUENCES DE L'AGRESSIVITE	133
1.1. LES MECANISMES EN JEU LORS D'UNE VICTOIRE OU D'UNE DEFAITE	133
1.2. L'HYPOTHESE DES INDICES SOCIAUX	136
1.3. L'HYPOTHESE CONTEXTE DEPENDANT	137
2. EXPLIQUER LES CONSEQUENCES DES MODIFICATIONS NEURONALES	137
2.1. QUALIFIER LA NATURE DE L'AGRESSIVITE ENGENDREE	138
2.2. L'HYPOTHESE D'UNE ATTRIBUTION DE VALEUR BIAISEE	139
2.3. L'HYPOTHESE D'UNE MEMOIRE ALTEREE	140
2.4. L'HYPOTHESE DES DANS ET D'UN SYSTEME DE RECOMPENSE	142
2.5. L'HYPOTHESE D'UN ETAT INTERNE ALTERE	144
2.6. LA PISTE OUVERTE PAR LA DOUBLE-TRANSMISSION	146
2.6.1. UN MODELE DE RELARGAGE A DEFINIR, ET UN ROLE DE L'OA A EXPLORER	146
2.6.2. L'IMAGERIE CALCIQUE POUR ETABLIR DES LIENS DE CAUSALITE	147
2.7. UN EFFET SPECIFIQUE AUX MALES	148
2.8. LES APL ET DPM : DES PARTENAIRES SYNAPTIQUES DES MBON-11	150

3. LA PERTINENCE DU PASSAGE DE LA DROSOPHILE A L'HUMAIN	151
CONCLUSION ET IMPLICATIONS	153
BIBLIOGRAPHIE	154
ANNEXES	193
TABLE DES ANNEXES	194

Table des abréviations

- 5-HT** : 5-hydroxytryptamine, sérotonine
5-HT_{1A} /5-HT_{1B}/5-HT₂ : Récepteur à la sérotonine 1A, 1B, 2
7T : (z)-7-tricosene
ADN : Acide désoxyribonucléique
AF : Attaque forte
AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique *receptors*, récepteur au glutamate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AN : Attaque normale
ANOVA : *Analysis of Variance*, analyse de variance
APL : *Anterior paired lateral neurons*
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNi ou RNAi : Acide ribonucléique interférent
BNST : *Bed nucleus of the stria terminalis*, noyau du lit de la strie terminale
BORIS : *Behavioral Observation Research Interactive Software*, logiciel d'analyse semi-automatique du comportement
CADABRA : *Caltech Automated Drosophila Aggression-Courtship Behavioral Repertoire Analysis*, outil d'analyse automatique du comportement de la drosophile
CH503 : (3R,11Z,19Z)-3-acetoxy-11,19-octacosadien-1-ol, phéromone anti-aphrodisiaque
CI ou CVI : *courtship index* ou *courtship vigor index*, index de cour ou de vigueur de cour
CL : Corne latérale
CNV : Corde nerveuse ventrale
CO₂ : dioxyde de carbone
CP : Corps pédonculés
CPG : *Central pattern generator*, neurones générateurs de patterns centraux
CS : *Canton-Special*, lignée contrôle de drosophile
cVA : 11-*cis*-Vaccenyl Acétate
DA : Dopamine
DAMB : *Dopaminergic receptor in the Mushroom body*, récepteur DA des corps pédonculés
DAN : *Dopaminergic neurons*, neurones dopaminergiques
dDA1 ou Dop1R1 : *drosophila dopaminergic receptor 1*, récepteur dopaminergique 1 de la drosophile
dsx : gène *doublesex*
DH44 : *diuretic hormon 44*, hormone diurétique 44
dD2R : *drosophila D2 family receptor*, récepteur DA de la famille D2 de la drosophile
DPM : *Dorsal paired medial neurons*
DR2 : *Dopamine receptor 2*, récepteur dopaminergique type 2
dTRPA1 : *drosophila Transient Receptor Potential-A1*
dVGLUT : *drosophila vesicular glutamate transporter*, transporteur vésiculaire du glutamate

de la drosophile

ESS : *Evolutionarily stable strategy*, stratégie évolutivement stable

fru : gène *fruitless*

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

GABA_A : Récepteur au GABA type A

GABA_B-R1 ; GABA_B-R21 ; GABA_B-R3 : Récepteur au GABA type B sous type 1 ; 2 ; 3

GAD1 : Glutamate décarboxylase 1

GLM : *Generalized linear model*, modèle linéaire généralisé

GLS : Glutaminase

GLU : Glutamate

GluCl α : *Glutamate-gated chloride channels subunit α* , sous-unité α du canal chlorure glutamate-dépendant

GOT2 : *Glutamic-oxaloacetic transaminase*

Gr32a : *Gustatory receptor*, récepteur gustatif 32a

GS2 : Glutamine synthétase 2

CHC : *cuticular hydrocarbon*, hydrocarbure cuticulaire

Hz : Hertz

IR84a : *Ionotropic receptor 84a*, récepteur ionotropique 84a

JH : *Juvenile hormone*, hormone juvénile

KC : *Kenyon cells*, cellules de Kenyon

LA : Lobe antennaire

LC1 : *lobula columnar 1 neurons*, neurones lobule colonnaire 1

LED : *light-emitting diode*, diode émettrice de lumière

mGluR₁ : *metabotropic glutamate receptor subtype 1*, récepteur métabotropique au glutamate de sous-type 1

MBON : *Mushroom body output neuron*, neurone de sortie des corps pédonculés

MPOA : *Medial preoptic area*, aire pré-optique médiane

NA : Noradrénaline

NMDAR : N-Méthyle-D-Aspartate *Receptors*, récepteur au glutamate

NPF : Neuropeptide F, et par extension neurones exprimant le NPF.

NSO : Neurone sensoriel olfactif

OA : Octopamine

Or13a/Or22a/Or35a/Or65a/Or67d : *Olfactory receptors*, récepteurs olfactifs, 13a, 22a, 35a, 65a et 67d

PAM : *Protocerebral anterior medial*, neurones dopaminergiques

pH : potentiel hydrogène

PLP : Protocerebrum latéral postérieur

PMPV : *Posterior medial protocerebrum, ventral* protocérébrum postérieur médian ventral

ppk25 : *pickpocket25*, récepteur

PPL : *paired posterior lateral neurons*

PPM3 : Protocerebrum postérieur median 3, groupe de neurones

Rdl : *Resistant to dieldrin*, récepteur GABA

SERT : *serotonin transporter*, transporteur à la sérotonine

SIP : *superior intermediate protocerebrum*, protocérébrum supérieur intermédiaire

SLC : *solute carrier protein*, protéine porteuse de soluté
SLP : *superior lateral protocerebrum*, protocérébrum latéral supérieur
SMP : *superior medial protocerebrum*, Protocerebrum médian supérieur
SOG : *Suboesophagian ganglion*, ganglion suboesophagien
SPN : *serotonergic projection neuron*, neurone de projection sérotoninergique
Shi^{ts} : *shibire^{ts}*, variante thermosensible du gène *shibire*
T_{ac} : Temps à tenter des accouplements
T_{βh} : Tyramine-β-hydroxylase
T_{Ch} : Temps de *chasing*, de poursuite
T_{dc2} : Tyrosine decarboxylase 2
T_F : Temps passé auprès de la femelle
T_L : Temps passé auprès du *loser*, du perdant
T_M : Temps passé auprès du mâle
T_{Obs} : Temps total d'observation
T_t : Temps à montrer du *tapping*, tapotement
T_{UWE} : Temps d'extension unilatérale de l'aile
T_w : Temps passé auprès du *winner*, du gagnant
tra : gène *transformer*
UAS : *Upstream activating sequence*, séquence d'activation en amont
UWE : *Unilateral wing extension*, extension unilatérale de l'aile
VGAT : *vesicular GABA transporter*, transporteur vésiculaire du GABA
VGLUT : *vesicular glutamate transporteur*, transporteur vésiculaire du glutamate
VLP : *ventrolateral protocerebrum*, protocérébrum ventrolatéral
VMAT : *vesicular monoamine transporter*, transporteur vésiculaire des monoamines
VMH : *ventromedial nucleus of the hypothalamus*, noyau ventromédian de l'hypothalamus
VPM4 : *Ventral Paired Neuron 4*
WT : *wing threats*, menace d'aile

Index des figures

FIGURE 1 : LE CYCLE DE VIE DE LA DROSOPHILE	25
FIGURE 2 : LE DIMORPHISME SEXUEL CHEZ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	26
FIGURE 3 : FONCTIONNEMENT DU COMPLEXE BIPARTITE UAS/GAL4	27
FIGURE 4 : FONCTIONNEMENT DU COMPLEXE BIPARTITE UAS/GAL80 ^{TS} , ADAPTE DE CAYGILL & BRAND, 2016	28
FIGURE 5 : DYNAMIQUE DES COMBATS ENTRE MALES <i>D.MELANOGASTER</i>	35
FIGURE 6 : RITUEL DES COMPORTEMENTS DE COUR (ADAPTE DE YAMAMOTO, 2014)	37
FIGURE 7 : SCHEMA DU CIRCUIT DE L'INTEGRATION OLFACTIF DES ODEURS, ADAPTE DE ZHAO & MCBRIDE, 2020	41
FIGURE 8 : LES 4 HYPOTHESES DE LA DOUBLE-TRANSMISSION, ADAPTE DE EL MESTIKAWY <i>ET AL.</i> , 2011	50
FIGURE 9 : MODELE DU CIRCUIT LC1-MAL-P1 PERMETTANT LA PRISE DE DECISION, ADAPTE DE KOGANEZAWA <i>ET AL.</i> , 2016	52
FIGURE 10 : LES CIRCUITS DE LA COUR, DE L'ACCOUPEMENT ET DE L'AGRESSION DES MALES, TIRE DE LEE & WU, 2020	54
FIGURE 11 : ANATOMIE DES CORPS PEDONCULES TIRE DE JANELIA.ORG, D'APRES LE TRAVAIL DU RUBIN LAB	55
FIGURE 12 : COMPARTIMENTATION DES CORPS PEDONCULES ET INNERVATION DES DAN, ADAPTE DE ASO <i>ET AL.</i> , 2014	56
FIGURE 13 : DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX POUR TESTER L'AGRESSIVITE	66
FIGURE 14 : CHAMBRE D'ENREGISTREMENT DES ARENES A HAUTE TEMPERATURE	67
FIGURE 15 : MODELE DES CONNEXIONS VPM4/MBON-11 REGULANT L'AGRESSIVITE	130

Index des tableaux

TABLEAU 1 : LES DIFFERENTES STRATEGIES DE SMITH & PRICE (1973)	15
TABLEAU 2 : LES DIFFERENTES CONDITIONS DE TEST DU COMPORTEMENT AGRESSIF	32
TABLEAU 3 : ETHOGRAMME DES COMPORTEMENTS AGRESSIFS DE LA DROSOPHILE, ADAPTE DE CHEN ET AL., 2002	34
TABLEAU 4 : ETHOGRAMME DES COMPORTEMENTS DE COUR DE LA DROSOPHILE, ADAPTE DE YAMAMOTO ET AL., 2014	37
TABLEAU 5 : LIGNEES UTILISEES DANS LES DIFFERENTS CHAPITRES	65

INTRODUCTION

Définitions de concepts

Expression et influences des comportements sociaux

Drosophila melanogaster comme modèle animal d'étude

Problématique

1. Définitions des concepts

1.1. Etude des comportements & comportements sociaux

Les premières lignes de ce manuscrit viseront avant tout à poser un cadre de définitions sur les concepts exploités dans ces travaux. Elles seront d'abord très larges pour que chacun puisse comprendre ce dont il est question, puis plus précises pour poser les bases des définitions que nous utiliserons.

Traisons dans un premier temps l'éthologie. Du grec « ethos », mœurs et logos, « science », elle se définit comme « *l'étude biologique du comportement animal* » (Tinbergen, 1963). La pratique en soi est ancienne, Aristote dans son ouvrage *Histoire des Animaux* en -343 le faisait déjà (Aristote, 343av. J.-C.), notamment dans ses traités *Parties des animaux* ou encore *Génération des animaux* dans lesquels il tente d'expliquer et de comprendre le fonctionnement des membres et organes du corps, et des comportements des animaux. Ainsi, il exprimait déjà une forme d'analogie entre les espèces en comparant la finalité commune de membres différents comme entre la main humaine et la pince du crabe (Aristote, 343av. J.-C.). Mais en tant que science « moderne », l'éthologie est relativement nouvelle et jeune. Ses principes ont été posés par Nikolaas Tinbergen en 1963 (Tinbergen, 1963). Parmi eux, quatre questions guident l'éthologue avisé et ce encore aujourd'hui : 1) Quel est la cause du comportement ? 2) Quel est son développement chez l'individu ? 3) Quelle est sa fonction, sa valeur pour la survie ? 4) Quel a été son évolution au sein de l'espèce ? (Tinbergen, 1968). Les deux premières questions (causes et développement) cherchent les explications dites proximales, c'est-à-dire comment le comportement émerge chez l'individu. Les deux dernières (fonction et évolution) cherchent les explications dites ultimes, c'est-à-dire pourquoi le comportement a émergé chez l'espèce. Dans les travaux présentés ici, le focus se portera sur la première question : les Causes. Aujourd'hui, les réponses à ces questions sont enrichies par de nombreux domaines qui vont au-delà de l'éthologie seule : la physiologie, la neurologie, la génétique ou encore les neurosciences pour n'en citer que quelques exemples.

Une question se pose : c'est quoi un comportement ? La question n'est triviale qu'en apparence. Encore récemment, des réflexions sont menées pour chercher à cerner ce terme pour savoir s'il est par exemple possible de l'étendre aux végétaux (Muszynski & Malaterre, 2020). Mais il n'est pas nécessaire d'aller aux confins de la philosophie des sciences pour rencontrer des difficultés. Même parmi les biologistes du comportement, cette notion n'est pas toujours

INTRODUCTION

consensuelle (Levitis et al., 2009). Pire, pour ainsi dire, aucune description de ce qui pouvait être considéré comme comportement, parmi les 33 de l'étude de Levitis, n'a su dégager un consensus total. Au mieux, le consensus était de 93%. Face à ce constat et sur cette base, Levitis *et al.* ont alors suggéré de définir comportement comme « *l'ensemble des réponses internes coordonnées (actions ou inactions) de l'entièreté d'un organisme vivant (individus ou groupes) à des stimuli internes et/ou externes, en dehors des réponses comprises comme des changements développementaux* » (p.108) (Levitis et al., 2009). C'est cette définition que nous garderons en raison du fait que celle-ci couvre chaque aspect qui constitue un individu, de son fonctionnement le plus microscopique à son comportement observable à l'œil nu. Il s'agit également d'une définition assez bien admise aujourd'hui.

Maintenant que nous savons ce qu'est un comportement, il faut savoir qu'ils peuvent être regroupés en plusieurs catégories. Les comportements agressifs et reproducteurs qui nous intéresseront ici sont tous deux qualifiés de sociaux. Un comportement social, selon la définition de Robinson, Russel & David (2008) (Robinson et al., 2008) est un comportement qui « *implique des interactions entre membres d'une même espèce d'une façon qui influence les comportements immédiats ou futurs* ». Ils ajoutent : « *l'un des fondements du comportement social est la communication. Un dénominateur commun à travers les espèces est la production, la réception et l'interprétation de signaux qui influencent le comportement de l'individu en fonction du contexte social* » (p.1). Ainsi, bien que cela ne soit pas un lien intuitif, nous considérerons au cours de ce travail la drosophile comme un modèle animal permettant l'étude des comportements sociaux. En effet, elle possède des capacités de productions, de réceptions et de traitements de phéromones capable directement d'influencer son comportement agressif et reproducteurs, mais nous y reviendrons en détails plus tard (Billeter & Levine, 2015; Dembeck et al., 2015; Farine et al., 2012; Wang & Anderson, 2010).

1.2. Agressivité et fonctions

L'agressivité est un comportement à la fois inné et appris. Inné, car il n'est pas rare de voir des juvéniles exprimer une forme d'agressivité quand bien même ceux-ci n'ont jamais appris ou vu un conspécifique se montrer agressif. Appris, car de nombreux mécanismes modulent ce comportement à la hausse ou à la baisse, notamment en fonction des expériences (Eaton et al., 2015; Karino & Someya, 2007; Kim et al., 2017; McClearn, 1971; Trannoy et al., 2016; Yamaguchi, 2022). Ces aspects seront développés plus en détail dans la section 3.4.

INTRODUCTION

En éthologie, l'agression est vue en termes de moyens plutôt qu'en termes de fin. Tinbergen, dans son article de 1968 dans lequel il discute de l'agressivité de l'Homme à travers le prisme du comportement animal, qualifie d'agressif un comportement qui « *implique d'approcher un adversaire et, quand on est à portée, de le repousser, de lui infliger des dégâts, ou au moins lui imposer des stimuli qui le soumettent* » (p.1412). Il continue en ajoutant que la fonction du comportement est d'au mieux éloigner l'individu, au pire d'infléchir les comportements de l'adversaire dans un seul but : cesser toute interférence du comportement de l'autre avec celui de l'émetteur. « Être agressif, c'est maintenir la distance entre moi et l'autre de sorte qu'il n'interfère plus avec moi ». La finalité de l'agressivité serait le contrôle de l'espace, de la mise à distance entre les individus dans leur intérêt et celui de l'espèce afin d'obtenir ressources ou retrait de stimulus négatif (Baenninger, 1974; Eibl-Eibesfeldt, 1977; Lorenz, 1969). Mais comment s'exécute cette mise à distance ? En règle générale et chez une large variété d'espèce vertébrés et invertébrés, les comportements agressifs suivent des rituels allant de la menace dissuasive à l'attaque physique (Lorenz, 1969; Briffa, 2010; Huxley, 1966). Nous détaillerons la forme de ces stratégies dans la section 2.1.

Si être agressif facilite l'accès aux ressources et donc la survie et le succès reproducteur de l'individu, une question s'impose : pourquoi les animaux ne montrent pas des comportements de plus en plus agressifs malgré l'avantage qu'ils procurent comme semble prédire la théorie de l'évolution selon Darwin (Darwin, 1859). Cette question a été brillamment répondue par les travaux en théorie des jeux évolutives qui ont montré que cette stratégie visant à éliminer l'adversaire n'est valide qu'en certains contextes très précis (*e.g.* une espèce qui ne se reproduirait qu'une seule fois dans sa vie et dont le combat définit qui pourra se reproduire) (Briffa, 2010; Smith & Price, 1973). Nous reviendrons plus en détail sur cette étude dans la section 2.1.1.

Pour certains auteurs, il est nécessaire d'inclure les notions de contexte et de récepteur dans l'interaction agressive (Díaz, 2010; Moyer, 1976). Lorenz disait que l'agressivité doit revêtir un intérêt adaptatif (Lorenz, 1969). Or la notion de contexte permet justement de mieux qualifier la nature de l'agression et de juger de son adaptabilité (Natarajan & Caramaschi, 2010). A titre d'exemple, Moyer proposait 8 catégories d'agressivité en fonction du contexte : 1) la prédation, 2) l'agression causée par la peur, 3) la dominance exercée par un animal au rang social plus élevée, 4) l'agression causée par la douleur, 5) territoriale, 6) des femelles (et parfois des mâles) envers un intrus approchant la progéniture, 7) dirigée contre un objet de frustration et 8) associée à la compétition sexuelle (Díaz, 2010; Moyer, 1976). Nous pourrions débattre de

INTRODUCTION

la pertinence de ces contextes, mais ici je voudrai mettre en valeur le fait que très rapidement on a attribué au contexte une importance dans la nature, l'expression et l'intensité des comportements agressifs qui pouvaient varier dans l'absolu tout en restant adapté relativement au contexte. On ne prédate pas de la même façon que l'on défend son territoire ou ses petits ou que l'on domine socialement par exemple. La seconde notion de récepteur permet quant à elle de pleinement appliquer l'aspect communicatif de l'agressivité. Autrement dit, on ne peut pas être agressif seul *stricto sensu*. Considérer les réponses et la posture du récepteur, que certains auteurs appellent « comportement agonistiques » (Grether et al., 2013; Scott, 1969) apporte un nouvel angle d'analyse. Du point de vue du récepteur, si le récepteur est neutre, en pleine démonstration de soumission ou manifestement hostile, la nature de l'attaque de l'émetteur changera en fonction de cette posture. Si l'émetteur attaque en réponse à une attaque du récepteur, ce sera de la défense. S'il attaque un récepteur soumis, ce sera une agressivité dérégulée. Du point de vue de l'émetteur, si suite à son attaque le receveur fuit instantanément, l'émetteur est désigné gagnant. Si le récepteur ne vacille pas, à stimuli égaux de la part de l'émetteur, il y a au mieux une égalité, au pire une défaite pour l'émetteur. Ces notions mènent à des classifications plus générales du comportement agressif comme celle de de Boer et de Tinbergen qui distingue les comportements agressifs d'attaque et de défense (de Boer, 2016; Tinbergen, 1968).

Prenons quelques lignes pour synthétiser toutes ces informations. Si je devais me baser sur les définitions précédemment développées pour en tirer une définition complète de l'agressivité, je proposerai la définition suivante : Les comportements agressifs font partie 1) d'un système de communication ritualisé et adapté 2) entre un émetteur et un récepteur 3) dans le but d'éloigner le récepteur et/ou de faire cesser toutes interférences provenant du récepteur sur les comportements de l'émetteur 4) dans un contexte orientant le comportement vers un but (obtention d'une ressource, défense...). Comme tout comportement, l'agressivité peut subir des dérégulations et adopter des formes anormales. Serait-ce alors ce que l'on appelle la violence ?

1.3. Définir une agressivité dérégulée

Parmi les premiers éthologues à l'avoir étudié, Lorenz utilisait ce terme de violence pour désigner une agressivité dérégulée, *i.e.* une agressivité perdant toute valeur adaptative (Lorenz, 1969). Cette notion d'adaptation est centrale pour Lorenz pour distinguer l'agressivité de la violence. Selon lui, ces phénomènes intervenaient dès lors qu'une sélection s'exerce au sein de

INTRODUCTION

l'espèce, indépendamment de toute interaction avec l'environnement. Autrement dit, la violence apparaît au sein des espèces dès lors qu'elles sont libérées de la pression environnementale et que seule la pression exercée par l'espèce domine. Aujourd'hui, les termes sont plus variés : « *Escalated aggression* » (agression outrée, adjectif peu utilisé en ce sens mais qui signifie « poussée à l'extrême ») ou « *hyper-aggressivity* » (hyperagressivité) côtoient parfois le terme de violence. A mon sens, ces trois termes reflètent un même comportement, mais n'implique pas les mêmes raisons.

La violence est un comportement agressif « *hors de contrôle (désinhibé), hors de contenu (modèle et structure du combat agonistique) et hors de contexte* » (Natarajan & Caramaschi, 2010). La violence échappe à toute forme de régulation. Elle ne suit plus le rituel habituel de l'espèce qui est souvent une escalade progressive qui s'arrête aux premiers signes d'abandon de l'adversaire et est suivie de comportements post-combat. Enfin, elle est détachée de tout contexte environnemental pertinent tant au sens large qu'en terme de nature de l'adversaire qui subit alors des attaques indépendamment de sa condition (*e.g.* mâle manifestement blessé et en posture de soumission, juvéniles, femelles...). Ces trois défauts font perdre à l'agressivité sa valeur adaptative, un des critères centraux selon Lorenz, rappelons-le. (Lorenz, 1969; Natarajan & Caramaschi, 2010). La notion de communication disparaît également lorsque ces critères ne sont pas respectés : la violence est pour ainsi dire sourde et aveugle.

L'agression outrée renvoie l'idée d'une agressivité hors de contrôle mais dont le contexte et le contenu restent cohérent. Il s'agirait d'un rituel agressif qui atteindrait ses formes les plus intenses. Cela est en général exceptionnel et marginal et n'intervient que lorsque deux individus ont une force si équivalente qu'ils ne peuvent être départagés qu'en poussant l'un et l'autre dans ses derniers retranchements (Parker, 1974). En ce sens, cette forme d'agressivité peut être pertinente et adaptée, même si ce manque d'inhibition est suffisant pour mener à la mort de certains individus (Wilkinson & Shank, 1976).

L'hyperagressivité quant à elle serait plus anormale. Elle impliquerait à la fois un défaut de contrôle et de contenu, tout en maintenant un contexte normal. Les individus en présence emploieraient d'emblée leurs comportements les plus intenses sans respecter l'escalade progressive ou les signes de soumissions de l'adversaire. De par ce manque de proportion dans l'énergie investie, l'hyperagressivité perd une partie de sa valeur adaptative.

En résumé, la violence se définit comme une agressivité hors de contrôle, de contenu et de contexte, perdant tout intérêt adaptatif et communicatif. Nous avons pu discerner d'autres

INTRODUCTION

termes que nous différencierons de violence : l'agressivité outré qui est seulement hors de contrôle, et l'hyperagressivité qui est à la fois hors de contrôle et de contenu. Nous verrons plus loin, au moment d'aborder l'expression et les stratégies de l'agressivité dans la section 2.1, comment et pourquoi la violence n'a pas été une stratégie conservée au fil de l'évolution.

Avant cela, il convient à présent de définir les comportements de cour et reproducteurs dont la définition sera, je pense, plus aisée à décrire et à comprendre. La complexité ici résidera dans le fait qu'au final, reproduction et agressivité sont intrinsèquement liés, malgré l'apparente relation exclusive qui existe entre l'un et l'autre.

1.4. Définir la reproduction

Associés aux comportements agressifs, les comportements reproducteurs prennent une part importante dans le processus de sélection sexuelle, largement présente dans le règne animal (Clutton-Brock, 2007). Ces derniers peuvent être brièvement défini comme étant « *toutes activités dirigées vers la perpétuation d'une espèce. [...] Le comportement reproducteur chez les animaux inclus tous les événements et actions directement impliqué dans le processus par lequel un organisme génère au moins un remplacement de lui-même* » selon une définition rédigée par Neal Griffith Smith dans l'encyclopédie Britannica (*Reproductive Behavior / Definition, Examples, Animals, & Facts / Britannica, 2024*). A titre personnel, je remplacerai « génère » par « assure ». Ainsi, nous pourrions y inclure les différents types de comportements reproducteurs tels que 1) les comportement pré-copulatoires comme les comportements de cour, 2) les comportements copulatoires en eux-mêmes et 3) les comportements post-copulatoires comme la garde de partenaire, ces derniers risquant d'être exclus de la définition de Neal Griffith Smith si l'on cantonne la reproduction à la génération d'un remplacement.

Tout comme l'agressivité, les comportements reproducteurs ont une composante innée et une acquise modulable par l'environnement et l'expérience. Des signaux chimiques tels que des phéromones interviennent dans le déclenchement des comportements reproducteurs de façon innée (Fernández & Kravitz, 2013; Petrulis, 2013). Par contre, la préférence du choix du partenaire peut dépendre de nombreux facteurs comme son statut (Maruska, 2014; Sapolsky, 2005), son âge (Kuo et al., 2012; Yuan et al., 2023) ou de la condition des mâles choisie par d'autres femelles (Danchin et al., 2018; Kavaliers & Choleris, 2017). De plus, la disponibilité des individus à recevoir ou émettre les signaux de cour peuvent dépendre de la saison (D'Occhio

INTRODUCTION

et al., 2020; Kárpáti et al., 2023). Enfin, l'apprentissage a un fort impact sur la reproduction des individus, comme dans le cas de l'apprentissage des chants chez les oiseaux qui sont cruciaux pour rendre les femelles réceptives (Verzijden et al., 2012).

On oppose souvent les comportements reproducteurs et agressifs: en général l'activation de l'un nécessite l'inactivité de l'autre (Lorenz, 1969). Pour Lorenz, cela est notamment dû au fait que les comportements reproducteurs sont des ritualisations des comportements agressifs chez certaines espèces (Lorenz, 1969). Le processus de ritualisation est défini comme « *la naissance d'un nouveau mouvement instinctif dont la forme imite celle d'un mode de comportement variable, causé par plusieurs impulsions* » (p.67) (Lorenz, 1969). Très brièvement, un nouveau comportement de reproduction peut émerger en s'inspirant des modalités de fonctionnement du comportement agressif, souvent en les exagérant pour les rendre plus communicatifs et faire partie intégrante, à termes, du fonctionnement de l'espèce. A titre d'exemple, Lorenz utilise l'épinoche et son mouvement de zig-zag pendant les comportements reproducteurs. Les zigs, orientés vers la femelle, seraient motivés par l'agressivité, tandis que les zags, composante dirigée vers le nid, seraient motivés par la reproduction. Le rythme d'alternance entre zig et zag serait le fruit d'une ritualisation qui, prenant racines dans un comportement motivé par l'agressivité et la reproduction, permet une communication « exagérée » au service de la reproduction de l'espèce (Lorenz, 1969).

En plus de leur évolution, l'expression de la reproduction et de l'agressivité sont capables de s'influencer mutuellement au sein d'un même individu. En effet, ne pas pouvoir exprimer correctement les comportements reproducteurs peut amener une forme de frustration venant exacerber l'expression de l'agressivité (Ryvkin et al., 2024). Inversement, l'intensité de la compétition pour accéder aux femelles module l'agressivité : des femelles accessibles diminuent à terme l'expression de l'agressivité chez l'espèce, tandis qu'une compétition plus forte amène la descendance à exprimer des comportements agressifs plus marqués (Bath et al., 2021). Notons par ailleurs que l'expérience de combat des individus peut aussi avoir des conséquences sur les comportements reproducteurs, réduisant en général le succès des perdants (Filice & Dukas, 2019; Prunier & Trannoy, 2024; Teseo et al., 2016). Nous y reviendrons dans la section 2.3 au moment d'aborder le comportement agressif de la drosophile.

En résumé, les comportements reproducteurs sont centraux dans la perpétuation de l'information génétique d'un individu et plus généralement des espèces. Ils sont intimement liés aux comportements agressifs à plusieurs titres. Ils sont le fruit de leur ritualisation, et l'expression des uns influence l'expression des autres et inversement. Bien qu'ils soient innés,

les comportements reproducteurs sont largement influencés et influençables par l'environnement et l'expérience.

2. Expressions et influences

Au cours de la partie introductive, nous avons défini de nombreux concepts au cœur de ce travail de thèse : l'éthologie, le comportement, l'agressivité et la reproduction. Cette présente section tâchera d'apporter un ensemble de connaissances vis-à-vis de l'expression de ces comportements chez différentes espèces pour mieux en comprendre les tenants et aboutissants, ainsi qu'à détailler un certain nombre de facteurs pouvant influencer leur expression.

2.1. Les comportements agressifs

2.1.1. Stratégies comportementales

L'expression des comportements agressifs et les stratégies adoptées sont variées et variables. Néanmoins, à la base de la prise de décision de chaque agression se trouve la balance bénéfice-risque (Georgiev et al., 2013; Smith & Price, 1973). Selon les travaux de Smith & Price en théorie des jeux évolutives, la stabilité d'une stratégie dépend du bénéfice qu'elle engendre au sein d'une population exploitant majoritairement cette même stratégie : elle est stable si elle est rentable : les auteurs parlent alors d'*evolutionarily stable strategy* ou ESS (Sandholm, 2007; Smith & Price, 1973). Au contraire, elle s'efface au profit des alternatives plus rentables si elles existent. Smith & Price ont testé 5 profils différents résumés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**). Leurs agents peuvent faire une attaque d'intensité normale ou forte. Cette dernière est associée à un risque de blessure grave forçant la fuite de l'adversaire. Une fuite spontanée est aussi déterminée en fonction de la durée du combat, *i.e.* nombre de tours de la simulation. (Smith & Price, 1973).

INTRODUCTION

Tableau 1 : Les différentes stratégies de Smith & Price (1973)

PROFIL	STRATEGIE	EVOLUTIVEMENT STABLE ?
Mouse (<i>Souris</i>)	- Joue toujours Attaque Normale (AN) - Fuit à la moindre Attaque Forte (AF)	Non (Surclassé par Hawk et Bully)
Hawk (<i>Faucon</i>)	- Joue toujours AF - Fuit en cas de blessure.	Non (Surclassé par Mouse et Bully) Oui si le bénéfice attendu excède le coût d'une défaite.
Bully (<i>Persécuteur</i>)	- Commence avec AF - AF si reçoit AN - AN si reçoit AF - Fuit si reçoit 2 AF	Non (Surclassé par Hawk, Retaliator et Prober-Retaliator)
Retaliator (<i>Vengeur</i>)	- Commence avec AN - Joue AN si reçoit AN - Joue AF si reçoit AF	Oui (Équivalent à Mouse)
Prober-Retaliator (<i>Sondeur-Vengeur</i>)	- Commence généralement AN, peut AF. - Après avoir joué AF et reçu une AF, redescend à AN - Après avoir joué AF et reçu une AN, continue AF - Forte proba de AF si reçoit AF	Quasiment (en deuxième position juste après Retaliator)

En modélisant le résultat et le rendement des combats entre les agents, il en est ressorti que dans le cadre où le coût de la blessure dépasse la valeur de gain attendu en cas de victoire, la stratégie hyper-agressive Hawk se fait surclasser par d'autres : elle n'engendre pas la meilleure rentabilité coût/bénéfice. Sur la base de ces résultats, cela explique pourquoi les formes exacerbées d'agressivité n'ont pas été retenues par la sélection de l'évolution.

Notons que ces différents modèles reflètent une hétérogénéité qu'il est possible de retrouver entre les espèces voire les individus. En effet, une souris face à un prédateur préfère en général la fuite ou la cachette ou modifie ses activités pour éviter le prédateur. Mais elle peut montrer de l'agressivité en ultime recours si elle n'a pas d'autres choix (Apfelbach et al., 2005; D. C. Blanchard et al., 2011). Cette agressivité contrainte par les circonstances a été appelée « réaction critique » par Lorenz (Lorenz, 1969). D'autres espèces présentent des interactions agressives très intenses voire mortelles qui n'en demeurent pas moins adaptées. Les jeunes reines abeilles jaunes *Apis mellifera ligustica* engagent des combats mortelles face aux autres jeunes reines pour accéder à la tête de la colonie (Gilley, 2001). Ces reines se trouvent en fait dans un contexte particulier favorisant ces stratégies : cet unique combat est le seul qui

INTRODUCTION

déterminera qui pourra se reproduire. La valeur du bénéfice compensera toujours le coût de la victoire, amenant une stratégie du « quoi qu'il en coûte » (Leimar & McNamara, 2023; J. M. Smith & Price, 1973). D'autres espèces sont dans ce cas de figure comme certaines guêpes du figuier (Hamilton, 1979) ou l'araignée *Frontinella pyramitela* (Leimar et al., 1990).

Compte tenu du coup que cela engendre chez les individus, les stratégies agressives peuvent s'appuyer sur des mécanismes de relations sociales et hiérarchiques chez les espèces vivant en groupe pour en minimiser le nombre. Un rang élevé dans la hiérarchie assure une relation de dominance auprès de la plupart des membres du groupe et favorise l'accès aux ressources. (Buwalda et al., 2017; Dow & Schilcher, 1975; Fonberg, 1988; Tibbetts et al., 2022). La dominance est définie comme une forme de constance dans le résultat d'un combat entre deux individus, où le vainqueur constant est dit dominant, et le perdant subordonné (Drews, 1993). Les confrontations viennent souvent des individus de rang élevé envers ceux de rang inférieur (*downward heuristic*), mais peuvent aussi ne concerner que les individus de rangs proches (*close competitors*), ou éloignés (*bullying*) (Hobson et al., 2021). L'évaluation des capacités des autres peut se baser sur des indices sociaux (*e.g.* phéromones, blessures visibles...), ou sur les expériences passées ou observations (Rutte et al., 2006). Ainsi, l'agressivité est modulée par rapport aux autres individus dans le but de réduire le coût de ces interactions (Fonberg, 1988).

Une stratégie illustrant ce phénomène est le *eavesdropping*. Il consiste à observer le résultat d'un combat entre deux individus afin d'en tirer des informations sur leur capacité à combattre et de s'adapter en conséquence. Le modèle en théorie évolutive des jeux de Johnstone montre d'une part que le *eavesdropping* permet d'éviter les escalades inutiles contre des adversaires agressifs. Mais d'autre part, ces escalades sont plus fréquentes et plus intenses car le bénéfice d'une victoire est double : obtenir la ressource et communiquer son statut qui dissuadera les adversaires (Johnstone, 2001; Tibbetts et al., 2022). Selon Parker, les escalades n'interviennent que pour départager les individus de forces équivalentes. Autrement, les menaces des premières phases du combat suffisent pour dissuader l'escalade si l'écart de « force » est trop grand. (Parker, 1974).

En résumé, les stratégies comportementales sont variables d'un être vivant à un autre et une même espèce peut adopter une stratégie au profit d'une autre selon les contraintes exercées par son environnement et son mode de vie.

2.1.2. Influences environnementales et écologiques

Les facteurs environnementaux internes ou externes sont les facteurs les plus influents du comportement agressif (Kleszcz et al., 2022; Moyer, 1976). Ils peuvent engendrer différentes réponses selon la nature, l'intensité et la temporalité des états (*e.g.* peur, faim, *etc.*).

2.1.2.1. Les facteurs environnementaux internes

En fonction de ses besoins immédiats, le comportement de l'animal diffère pour y répondre. Certaines théories ont tenté de hiérarchiser ces besoins comme la pyramide de Maslow (Bridgman et al., 2019; Maslow, 1943) ou les quatorze besoins fondamentaux d'Henderson (Henderson, 1994). Pour Maslow, il existe 5 besoins chez l'humain : 1) physiologiques (*e.g.* manger, respirer, dormir, se reproduire...), 2) de sécurité, 3) d'appartenance et d'amour, 4) d'estime et 5) d'accomplissement de soi. Hormis les deux derniers d'ordre plus psychologique, ces besoins se retrouvent aisément chez l'animal. Ce qui me semble intéressant de noter sur la base de ces théories, c'est que la compromission d'un de ces besoins affecte l'individu qui changera son comportement en conséquence. La faim, besoin physiologique de premier rang, peut dépasser le besoin de sécurité et donc disposer l'individu à être agressif. En réalité, la faim peut engendrer une baisse comme une augmentation de l'agressivité. (Burnett et al., 2019; Edmunds et al., 2021). Cette relation en cloche \cap peut s'expliquer par les réserves énergétiques. Pour être agressif, il faut de l'énergie, or pour avoir de l'énergie il faut se nourrir. Lorsque les individus doivent combattre pour de la nourriture, l'agressivité est moindre à satiété car elle n'est pas stimulée par la faim et le besoin de se nourrir. Au pic de la courbe, la faim est devenue un besoin prioritaire donc l'animal mobilise les ressources énergétiques disponibles pour montrer de l'agressivité. En bout de courbe, la faim est très intense mais les ressources énergétiques sont amoindries et leur économie nécessaire : l'agressivité diminue. Notons par ailleurs la qualité du régime alimentaire et des nutriments permettent l'expression de comportement plus ou moins agressif chez des espèces comme la drosophile, le cochon nain de Göttingen ou encore l'être humain (Choy, 2023; Haagensen et al., 2014; Legros et al., 2021). Une hypothèse expliquant cette influence pourrait passer par le microbiote intestinal, c'est-à-dire l'ensemble des populations de bactéries vivant dans le tractus digestif d'un être vivant. Ce dernier a été impliqué dans des pathologies neurodégénératives comme Alzheimer où l'agressivité est un symptôme, mais aussi dans l'agressivité elle-même (Barrio et al., 2022; Grinberg et al., 2022; Lyketsos et al., 2011; Mikami et al., 2023; Sherwin et al., 2019).

INTRODUCTION

2.1.2.2. Les facteurs environnementaux externes

La prise de décision dépend d'un calcul entre le bénéfice attendu et les coûts potentiels engendrés par le comportement. Ce calcul dépend de la valeur de la ressource dans son aspect quantitatif et qualitatif. En effet, une ressource abondante n'amènera qu'une compétition indirecte où les individus ne feront pas de combats. Ils se contenteront d'amasser et de consommer un maximum de ressource possible. En revanche, une ressource restreinte de forte valeur amènera les individus à combattre pour son obtention (Georgiev et al., 2013). Ainsi, l'utilisation de stratégies agressives ou non et leur intensité varient en fonction des préférences des individus et de leur environnement.

Expérimentalement, il est possible de moduler la valeur du bénéfice attendu en modifiant sa disponibilité (*e.g.* grande surface de nourriture vs. Surface restreinte) ou sa valeur intrinsèque (nourriture diluée vs. Concentrée). Lim et collaborateurs ont par exemple montré que les drosophiles montraient de plus en plus d'agressivité au fur et à mesure que la nourriture était concentrée (Lim et al., 2014). La surface du territoire définit aussi l'intensité des combats : trop restreinte, la surface ne vaut pas le coup de combattre car la quantité est trop faible. Trop grande, la surface peut être partagée par les individus sans qu'il y ait de confrontations directes (Hoffmann & Cacoyianni, 1990; Lim et al., 2014).

A l'inverse, moduler le risque est plus délicat en plus d'ajouter un questionnement éthique. Le calcul du risque implique de nombreux facteurs et processus cognitifs (Blanchard et al., 2011). Certaines études altèrent l'évaluation de ce risque en modulant le niveau d'anxiété par des moyens pharmacologiques (Blanchard et al., 1993). D'autres semblent montrer qu'un faible risque exercé par l'environnement tend à réduire la compétition et l'agressivité chez une espèce de primate (Richter et al., 2015) tandis qu'inversement, l'exposition aux odeurs de prédateurs va réduire l'agression offensive mais drastiquement augmenter l'agression défensive de deux espèces d'hamster (Zhang et al., 2003).

En résumé, parmi les facteurs influençant l'agressivité, il y en a principalement de deux types : les externes et les internes. Ceux-ci s'influencent mutuellement, le déclenchement de l'agressivité étant l'aboutissement d'un calcul complexe pondérant à la fois les risques et les bénéfices.

2.1.3. Causes et conséquences de l'existence de l'hyper agressivité

Lorenz pensait que la violence émergeait quand seule la pression sélective de l'espèce mène l'évolution (Lorenz, 1969). Pour étudier la violence, il est difficile de se baser sur des observations dans la nature car, nous l'avons vu, ces stratégies ne sont pas favorisées par l'évolution. En laboratoire, il est possible de s'affranchir artificiellement des contraintes environnementales pour ne permettre qu'aux victorieux dans les combats de se reproduire. Ce protocole de sélection des géniteurs a mené à des lignées à l'agressivité dérégulée chez des vertébrés et des invertébrés (Beiderbeck et al., 2012; De Boer, 2018; Penn et al., 2010). En plus d'accorder une forme de vérité aux propos de Lorenz, ces sélections en laboratoire montrent une influence génétique dans la dérégulation du comportement agressif. Mais est-ce la seule ?

Le suspense sera bref : non. L'expérience de l'individu entre en ligne de compte. Reprenons l'exemple des vainqueurs que nous venons de mentionner. Même si l'on observe au bout de plusieurs générations une tendance « innée » à entreprendre des actes agressifs plus intenses, le comportement change aussi au niveau individuel, sans pour autant procéder à une sélection génétique. En effet, les vainqueurs montrent une augmentation notable de l'intensité des comportements agressifs (Schwartz et al., 2013). Gagner agit comme un renforcement positif avec comme conséquences un niveau d'excitation élevé et une désinhibition des comportements agressifs (Baenninger, 1974). Des victoires répétées exacerbent ces processus et facilitent l'escalade du combat (Rillich & Stevenson, 2011), voire amènent les individus à prendre des risques pour eux-mêmes dans le seul but d'infliger des attaques (Lagerspetz, 1964). En plus de ces sélections, des stress intenses comme un isolement social prolongé, imposés lors de périodes critiques du développement, peuvent également exacerber les réponses agressives (De Boer, 2018; Haller et al., 2014; Parise et al., 2023; Tóth et al., 2008).

D'autres modèles vont étudier l'influence des substrats biologiques. C'est le cas de l'hyperagressivité induite par des substances comme l'alcool, par un hypofonctionnement de l'axe corticotrope (« l'axe du stress ») ou à l'inverse par une surstimulation de l'hypothalamus. En général, ces modèles étudient l'hyperagressivité dans le cadre de pathologies (Natarajan & Caramaschi, 2010; Neumann et al., 2010; Siever, 2008).

D'après mes recherches bibliographiques, une seule étude chez *Betta splendens*, le poisson combattant, semble avoir réellement étudié et qualifié l'hyperagressivité et ses conséquences. Leurs conclusions vont dans le sens des conclusions de Smith & Price : les individus qui adoptent les stratégies à escalade rapide et hyper-agressives sont plutôt désavantagés à cause

INTRODUCTION

de la fatigue engendrée (Halperin et al., 1998). Des études moins directes existent et ont comparé les comportements agressifs et reproducteurs d'une lignée de drosophile contrôle (Canton Special, Cs) à la lignée hyperagressive Bully. Chez les Bully, l'hyperagressivité est fragile car une seule défaite inhibe leur agressivité lors de combats subséquents, ce qui ressemble finalement au profil Bully de Smith & Price (Penn et al., 2010). Soulignons que la cause génétique de l'hyperagressivité peut être contrebalancé par ses conséquences issues l'expérience. Concernant la reproduction, les conséquences de cette hyperagressivité semblent aller vers une stratégie reproductive moins efficace chez les Bully comparé aux Cs, les femelles étant moins attirées par les Bully (Defert & Trannoy, non publié ; Penn et al., 2010). En dehors de ces études, peu de connaissances quant aux conséquences des comportements hyperagressifs pour les individus existent à ce jour.

En résumé, l'hyperagressivité est un domaine dont l'étude reste relativement limitée. Au sein de ce domaine, l'attention porte surtout sur les causes ce comportement considéré pathologique, plus qu'aux conséquences pour les individus. Des modèles existent pour engendrer une agressivité pathologique et impliquent des facteurs génétiques, physiologiques, environnementaux et développementaux. Ceux-ci sont donc de même nature que ceux régulant l'agressivité, toutefois la plupart se distingue par leur caractère dysfonctionnel, allant à l'encontre du fonctionnement normal de l'individu. Les rares études sur les conséquences de l'hyperagressivité vont dans le sens des modèles de la théorie des jeux évolutives : l'hyperagressivité à long terme n'est ni payante, ni efficace.

2.2. Les comportements de cour

2.2.1. Stratégies comportementales

Les comportements reproducteurs sont régulés par les relations sociales, tout comme les comportements agressifs. Chez les poissons cichlidés, les dominants déploient un plus large répertoire comportemental que les dominés notamment par rapport à la défense de territoire, de l'agressivité et de la cour (Maruska, 2014). De plus, le statut est communiqué aux autres mâles par des couleurs vives de façon dynamique (Maruska, 2014). Ainsi, le statut de dominant facilite leur reproduction.

Néanmoins, quand les animaux ne vivent pas en groupe hiérarchisé, d'autres comportements vont définir l'accès aux femelles. Ces stratégies peuvent être une confrontation directe auprès

INTRODUCTION

des autres mâles (Nagy et al., 2021). Mais elles peuvent être aussi dirigée vers les femelles pour les attirer grâce aux vocalisations (Mhaouty-Kodja, 2020), chants (Baker et al., 2019; Spool & Ritters, 2017), parades (Schlinger et al., 2001) ou encore grâce à l'émission de phéromones spécifiques (Gaskett, 2007; Wicker-Thomas, 2007) ou à la modulation de quantité de gamètes produites (Yund & McCartney, 1994). Dans ce cas, ces manœuvres mettent en avant des signaux dits honnêtes sur les capacités reproductrices des individus, ce que Berglund et collaborateurs appellent armements (signaux des mâles envers les mâles) et ornements (signaux des mâles préférés par les femelles) (Berglund et al., 1996; Gaskett, 2007). Ainsi, les individus arriveront ou non à se reproduire selon la qualité de leurs performances et de leurs attributs.

Les stratégies s'étendent aux comportements post-copulatoires qui vont assurer la pérennité de la descendance. Chez les mâles, il est possible d'observer des gardes de partenaires pour prévenir tout accouplement ultérieur de la femelle. Cela peut être direct en empêchant un autre prétendant de s'accoupler (Sivinski, 1978) ou indirect par l'usage d'un bouchon d'accouplement (ou *sphragis*) (Gór et al., 2023; Saad et al., 2018; Shine, 2003) ou de phéromones réduisant la réceptivité de la femelle (Hosseini et al., 2016; Zawistowski & Richmond, 1986). Pour les femelles, les stratégies mises en place tournent autour de la pérennité de la descendance, comme la sélection d'un site et de méthode de ponte chez les moustiques (Day, 2016; Dindo & Nakamura, 2018). Les femelles peuvent adapter une réceptivité réduite pour les signaux reproducteurs mâles, voire se montrer agressives suite à leur accouplement comme c'est le cas chez certaines araignées (Gaskett, 2007). Chez les mammifères, les stratégies post-copulatoire peuvent être étudiés sous le prisme des relations entretenues après accouplement, comme monogame et soins biparentaux contre polygyne avec soins apportées par la femelle (Sue Carter et al., 1995; Young et al., 2001).

2.2.2. Influences environnementales et écologiques

L'environnement joue un rôle majeur dans la décision des stratégies à adopter que ce soit dans leur nature ou leur intensité, à l'image des comportements agressifs.

Dans la stratégie de la garde du partenaire évoquée plus haut, des paramètres environnementaux sont capables de la moduler. L'araignée *Trichonephila clavipes* montre une garde renforcée lorsque la compétition entre mâles est plus forte, en plus de facteurs plus intrinsèques aux individus (Del Matto et al., 2021). C'est là une illustration de l'interaction entre caractéristiques individuels et environnement modulant les comportements reproducteurs.

INTRODUCTION

De la même façon chez les oiseaux, l'intensité de la garde du partenaire est liée à la qualité du mâle : moins il possède de signaux reflétant une bonne qualité, plus intense est sa garde (Harts et al., 2016).

Chez les espèces d'ongulés, l'environnement influence l'adoption d'une des cinq stratégies de reproduction décrites par Bowyer (Bowyer et al., 2020). La qualité et de la défensabilité des ressources, la taille du groupe, la densité de la population et la défensabilité des femelles sont autant de paramètres qui font définir la stratégie. Notons que non seulement ces stratégies peuvent varier entre les espèces, mais aussi au sein d'une même espèce, comme l'illustre le cas de l'antilope cervicapre (Bowyer et al., 2020; Isvaran, 2005). Chez les ongulés, mais pas que, les périodes de reproduction sont souvent saisonnières et le fonctionnement physiologique des individus s'adaptent alors pour les préparer aux compétitions (Al-Bulushi et al., 2019; Graham et al., 2023; Renthlei et al., 2022; Shine, 2003; Wilkinson & Shank, 1976).

Enfin, le *eavesdropping* peut aussi s'appliquer au choix du partenaire. Ceci se retrouve chez certains poissons (Dugatkin, 1992), drosophile (Danchin et al., 2018), rongeurs (Kavaliere et al., 2017) ou oiseaux (Freeberg, 2004). Dans ces travaux, le choix du partenaire d'une femelle incite les autres femelles à choisir un mâle partageant les traits du mâle initialement choisi. Ce choix peut se baser par exemple d'une particularité physique comme une couleur de cuticule ou de pelage (Danchin et al., 2018; Kavaliere et al., 2017).

2.3. Les effets Winner et Loser

Nous venons de développer l'idée qu'agressivité et reproduction sont à la fois innés et appris, modulé par l'expérience. Pour le comportement agressif, l'une des principales sources d'expériences capable d'une telle modulation sont les expériences passées de combats et leur issu (défaite ou victoire). Cette influence est appelée effet gagnant et l'effet perdant (*Winner and loser effects*) dans la littérature.

Ces effets se définissent par l'influence de l'issu d'un combat précédent sur le combat qui le succède. Ainsi, l'effet perdant consiste en l'augmentation du risque de perdre le combat suivant après avoir expérimenté une défaite préalable. A l'inverse, l'effet gagnant est l'augmentation de la chance de gagner le second combat après avoir remporté le premier (Hsu et al., 2005). Les premières études qui ont démontré ces deux effets ont été faites chez le rongeur (Hsu et al., 2005; Seward, 1946; Van De Poll et al., 1982). Ces effets ont depuis été retrouvé

INTRODUCTION

chez de nombreuses espèces dont l'humain (Page & Coates, 2017; Smith & Dukas, 2024), les oiseaux, les mammifères, les reptiles, les poissons ou encore les insectes dont la drosophile (Amino & Matsuo, 2023; Hsu et al., 2005; Trannoy et al., 2016). Notons que l'effet loser est plus fréquent dans le règne animal et plus persistant dans le temps que l'effet winner, sûrement en raison d'une part de processus biologiques différents, mais aussi d'un biais favorisant la rétention des expériences négatives dans un intérêt évolutif.

Chez la drosophile, une seule défaite ou victoire est suffisante pour induire des effets observables à court terme (~3 heures), néanmoins une expérience répétée entraîne plus facilement un ancrage sur le long terme (~24 heures) de l'effet loser (Kim et al., 2018; Trannoy et al., 2016). De plus, une défaite rend les perdants beaucoup moins agressifs, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du risque de défaite (Yurkovic et al., 2006). La sérotonine (ou 5-HT) peut contrebalancer cet effet loser en promouvant de nouveau les comportements agressifs des perdants, notamment via les effets des neurones P1, que nous détaillerons en 3.5.5, sur les neurones de projection sérotoninergique (SPN) et les neurones exprimant le récepteur 5-HT1B dans le corps en ellipse (Hu et al., 2020).

Bien que ces effets soient issus des interactions agressives, leurs conséquences peuvent se généraliser à d'autres comportements. Par exemple, les gagnants prennent plus de risques, *i.e.* sont plus nombreux à traverser un trou de 3mm de longueur (l'équivalent de la longueur de leur corps) que des mouches naïves, et le contraire est observée pour les perdants qui se montrent plus prudents (Kim et al., 2018). Cette même étude démontre que l'issue d'un combat a des conséquences sur les capacités de cour et de reproduction : les perdants sont moins motivés à courtiser et courtisent moins intensément que des mouches naïves, alors que les gagnants ont plus de chance de s'accoupler avec des femelles. Nous approfondirons l'état de l'art des effets gagnant et perdant dans l'introduction du premier chapitre, mais notons qu'il s'agit là d'un lien de plus entre l'influence des comportements agressif et reproducteurs.

3. Le modèle Drosophile : intérêts et état de l'art

3.1. Quelques généralités

Communément appelée mouche à fruit ou mouche du vinaigre, *Drosophila melanogaster* dont le nom signifie littéralement « qui aime la rosée, ventre noire » d'après Wikipédia (« *Drosophila melanogaster* », consulté en Mai 2024), est un diptère d'environ 3mm de long.

INTRODUCTION

Dans l'histoire de la science, la drosophile a toujours été liée à de conséquents progrès sur la génétique. Grâce à elle, Morgan sera nobélisé en 1933 pour ses travaux sur l'existence des gènes sur les chromosomes comme source de transmissions des caractères héréditaires (Morgan, 1910). Un second point d'orgue de la génétique est le tout premier séquençage complet de génome qui était celui de la drosophile (Adams et al., 2000). Le génome humain, lui, ne sera séquencé que l'année suivante en 2001 par le consortium international du séquençage du génome humain (Lander et al., 2001). Fort de ce siècle de recherche centré sur la génétique pendant lequel le modèle drosophile a su s'étoffer de bien des outils dont certains seront décrit juste après dans la section 3.2, cet insecte demeure incontournable dès lors qu'une question ou une méthode implique des facteurs génétiques. D'autres modèles partagent ses forces comme le poisson zèbre, aussi étudiés dans le cadre de l'agressivité (Halpern et al., 2008; Jones & Norton, 2015; Zabegalov et al., 2019), néanmoins la drosophile se démarque par des contraintes éthiques qui, il faut le dire, sont bien plus souples que chez les vertébrés.

On dénombre aujourd'hui 283 articles référencés dans la *National Library of Medicine* (Pubmed) en effectuant une recherche avec « *Drosophila melanogaster* » et « *aggression* ». Derrière cet engouement se cache d'abord des raisons pratiques. *D. melanogaster* est un animal au temps de génération relativement court (**Fig. 1**). A partir du stade embryonnaire, une larve se développe au travers de 3 stades larvaires. Une fois le dernier stade atteint, la larve entame une phase de puppe pour procéder à sa métamorphose de larve à drosophile adulte. Plusieurs stades peuvent y être distingués : 1) la puppe blanche où la larve vient tout juste d'entamer sa phase de puppe, 2) la puppe jaune où la larve a entamé sa métamorphose, et 3) la puppe noire où la drosophile est constituée et visible par transparence avec l'aide d'une loupe binoculaire. A température optimale (~25°C), ce processus prend onze jours. Il est possible de ralentir le développement à une vingtaine de jours en abaissant la température (~20°C). Une fois adulte, les individus sont sexuellement matures au bout d'environ 3 heures et ont une période de forte fertilité pendant les deux premières semaines de vie environ. Le profil de leur hydrocarbures cuticulaires (HC), leur « signature chimique », est mature au bout d'environ 4 jours. L'espérance de vie d'un adulte est d'environ 3 mois en laboratoire. Le renouvellement rapide des individus est couplé à un entretien facile et peu coûteux ce qui en fait un modèle de choix. Leur nourriture, bien que variable entre les laboratoires, est standardisée au sein des structures de recherches et est principalement constitué d'eau, d'agar, de sucre, de farine et de levure.

Notons que *Drosophila melanogaster* présente un dimorphisme sexuel. Les femelles sont un peu plus grandes que les mâles (~4 vs ~3mm) et ont le bout de leur abdomen plus pointu et

INTRODUCTION

rayé là où les mâles sont plus ronds et noirs. Les mâles présentent également à leurs pattes avant des peignes sexuels leur permettant de monter la femelle lors de l'accouplement. Ils sont visibles lors des derniers stades de pupes, ce qui permet le sexage des individus (**Fig. 2**).

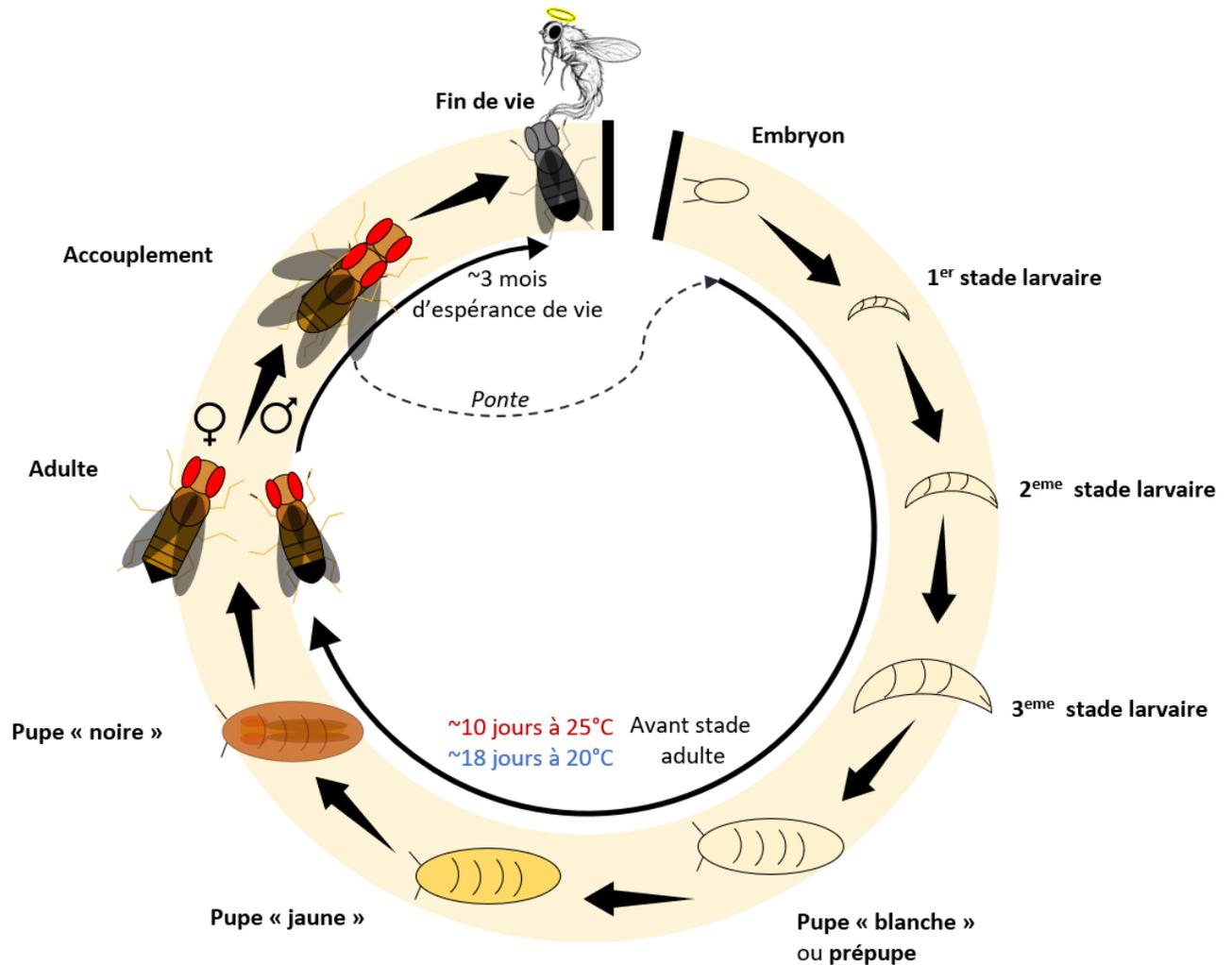


Figure 1 : Le cycle de vie de la drosophile

Le cycle de vie de la drosophile commence par un stade embryonnaire. S'en suit 3 stades larvaires pendant lesquelles la drosophile se nourrit et se développe. La larve entame ensuite son stade de pupes. D'abord l'état de prépupe (ou pupa blanche), puis pupa jaune et enfin noire. Le sexage des individus est possible dès le stade de pupa noire. L'adulte qui émerge de la pupa devient sexuellement mature au bout d'environ trois heures. La drosophile a une espérance de vie d'environ trois mois et son pic de fécondité se situe aux alentours des deux premières semaines de vie.

INTRODUCTION

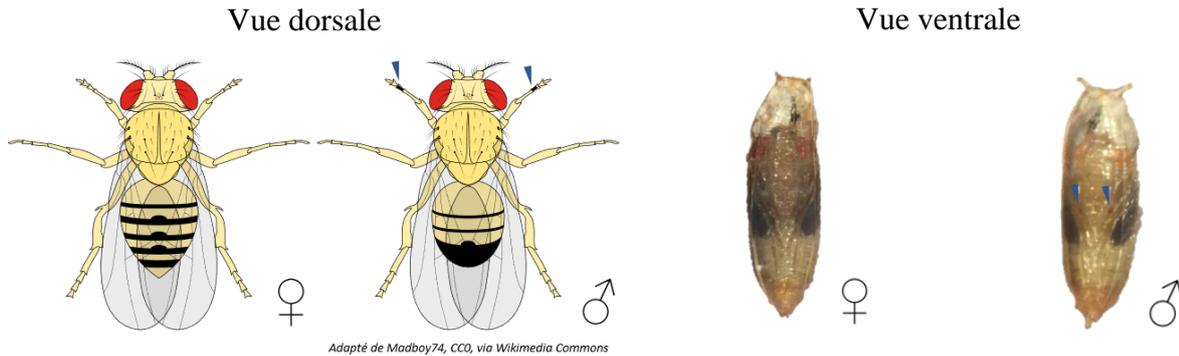


Figure 2 : Le dimorphisme sexuel chez *Drosophila melanogaster*

La femelle est généralement plus grande que le mâle, avec un abdomen un peu plus pointu et plus rayé que le mâle. Le mâle possède un abdomen plus rond dont l'extrémité est plus sombre et moins rayée. Le mâle possède également sur ses deux pattes avant des peignes sexuels noirs (pointé par les flèches bleu foncé) permettant à celui-ci de s'accrocher à la femelle lors de l'accouplement. Ces peignes sont visibles aux derniers stades de pupa (pupa noire) et permettent la différenciation mâle/femelle dès ce stade. La pupa, tout comme un adulte, mesure ~3mm.

3.2. Les outils génétiques

3.2.1. Le complexe bipartite UAS/GAL4 et ses variantes

Le premier outil génétique que nous aborderons et que nous avons largement utilisé dans nos travaux est le complexe bipartite UAS/GAL4, et sa variante UAS/GAL80^{ts}. Le développement de cet outil remonte aux années 90 (Brand & Perrimon, 1993). En quelques mots, cet outil permet d'exprimer un gène dans une population cellulaire donnée. Il est divisé en deux. D'une part, un facteur de transcription GAL4 est associé à un promoteur tissu spécifique permettant la transcription de la protéine GAL4 uniquement dans le tissu désigné par ce promoteur. D'autre part, une séquence UAS (*Upstream Activating Sequence*, séquence d'activation en amont) précède la séquence d'un gène rapporteur à transcrire. Initialement, les deux parties sont exprimés séparément chez deux lignées différentes : l'une n'exprimera que la partie GAL4, l'autre seulement l'UAS. En croisant des individus des lignées GAL4 et UAS, les descendants F1 exprimeront dans leur génome les deux parties. En se fixant sur la séquence UAS, la protéine GAL4 permettra la transcription du gène rapporteur uniquement dans le tissu cible (**Fig. 3**) (Caygill & Brand, 2016). Nous développerons dans les parties suivantes les différents gènes rapporteurs que nous avons exprimé. Pour contrôler l'effet de l'insertion de la séquence GAL4 ou UAS dans le génome, on associe systématiquement au génotype d'intérêt deux croisements contrôles où les lignées UAS et GAL4 sont croisées avec une lignée contrôle.

INTRODUCTION

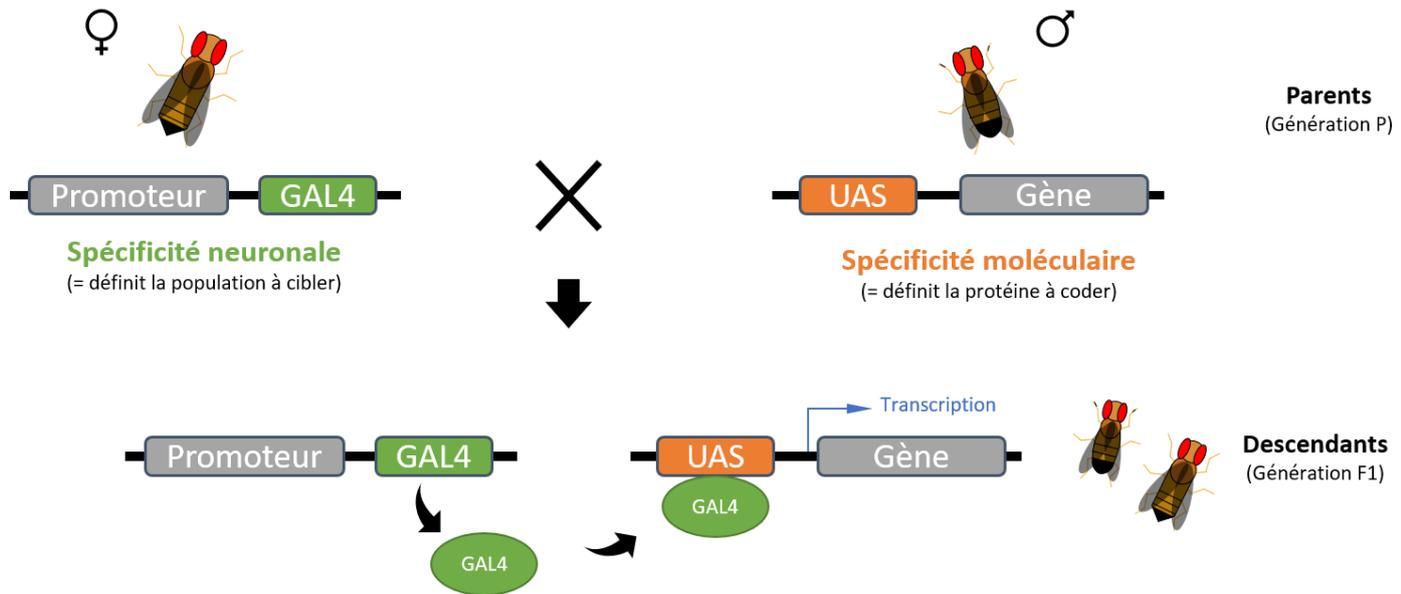


Figure 3 : Fonctionnement du complexe bipartite UAS/GAL4

Le génome des femelles est modifié pour intégrer la partie GAL4 du complexe. Il est associé à un promoteur tissu-spécifique afin de déterminer spécifiquement la population à modifier. Le génome des mâles intègre la partie UAS. Il est associé à une séquence codante de gène (dit rapporteur) qui sera transcrit. Seul, chaque partie est théoriquement inefficace. Lorsque ces mâles et femelles P sont croisés, leurs descendants F1 auront dans leur génome la partie GAL4 et UAS. La séquence GAL4 dans les cellules spécifiées code une protéine qui va se lier à la séquence UAS pour lancer la transcription du gène rapporteur seulement dans ces cellules.

Malgré sa puissance et son intérêt, le système UAS/GAL4 a un défaut non négligeable : c'est un système constitutif dont le contrôle temporel est très restreint, et qui peut engendrer des conséquences développementales. Le système UAS/GAL80^{ts} palie à ce défaut (**Fig. 4**) (McGuire et al., 2003). Le principe est le même sauf que la protéine GAL80^{ts} va se fixer sur la séquence UAS et empêcher la transcription du gène rapporteur en dessous d'une certaine température. GAL80^{ts} a une activité thermo-dépendante : en dessous de 29°C, cette protéine est fixée sur l'UAS. Au-dessus de 29°C cette protéine se détache de la séquence UAS et la transcription du gène rapporteur est possible (Caygill & Brand, 2016). Avec ce système, il est possible d'avoir un contrôle temporel dépendant de la température d'élevage.

INTRODUCTION

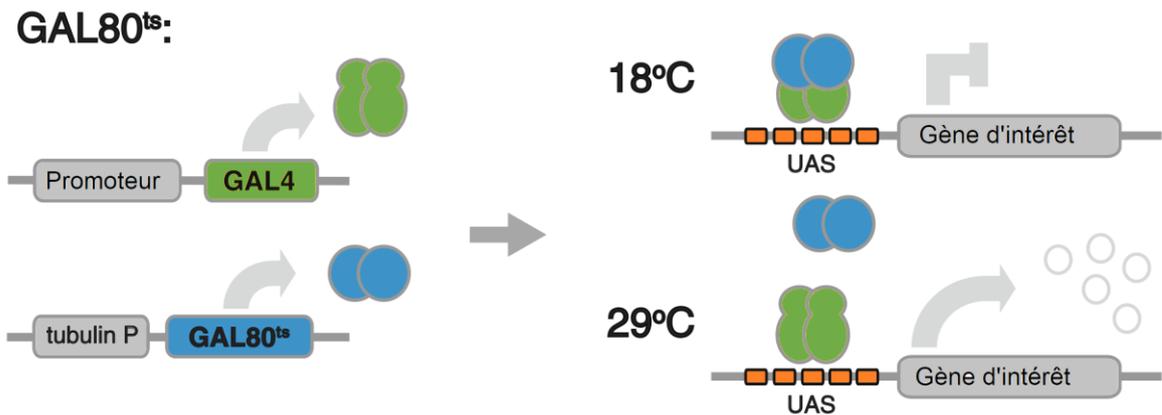


Figure 4 : Fonctionnement du complexe bipartite UAS/GAL80^{ts}, adapté de Caygill & Brand, 2016

UAS/GAL80^{ts} est composé en deux parties. D'une part le complexe UAS/GAL4 décrit précédemment : la séquence GAL4 (en vert) synthétise la protéine GAL4 qui se fixera sur la séquence UAS (en orange) afin de permettre la transcription d'un gène d'intérêt. D'autre part, la séquence GAL80^{ts} (en bleu) est associée au promoteur tubuline P pour l'exprimer dans toutes les cellules. Cette séquence code la protéine GAL80^{ts} qui est capable de se lier à la protéine GAL4 de façon thermodépendante. Classiquement, à 18°C, les molécules GAL4 et GAL80^{ts} sont liées ce qui empêche la transcription du gène d'intérêt. A 29°C, elles se délient et la transcription devient possible.

Enfin, mentionnons rapidement une dernière technique permettant une précision cellulaire beaucoup plus fine : le split-GAL4. Cette technologie consiste, comme son nom l'indique, à diviser le GAL4 en deux domaines : le domaine d'activation et le domaine de liaison à l'ADN. Chacun de ces domaines produisent une partie qui, une fois assemblées, formeront un équivalent GAL4 complet et actif pouvant se lier à la séquence UAS (Caygill & Brand, 2016). Cette technique est très puissante car permet de cibler un nombre de cellule restreint allant jusqu'à la cellule unique (Aso, Sitaraman, et al., 2014).

Pour comprendre les implications des modifications engendrés par l'emploi du complexe UAS/GAL4 et l'intégrer dans un système plus large, une connaissance du connectome est nécessaire. Or, il est aujourd'hui possible d'accéder gratuitement à des outils documentant ce connectome. Virtualflybrain est un site permettant de visualiser en 3D différents modèles de système nerveux centraux de drosophiles (larvaires ou adultes). On peut y visualiser des neurones, des structures, accéder à la bibliographie associée à cette imagerie, de visualiser des circuits reliant deux neurones tel un « GPS neuronal » (Court et al., 2023). Cet outil peut être couplé aux bases de données colossales existantes sur le connectome : Neuprint (Plaza et al., 2022) ou le codex de Flywire (Dorkenwald et al., 2023; Schlegel et al., 2023) permettent de connaître jusqu'au nombre de connexions entre deux neurones, dans quel sens (en amont ou en aval), ou encore le neurotransmetteur utilisé par ces neurones.

3.2.2. L'activation et l'inactivation induite du neurone : dTrpA1 et Shibire^{ts}

dTrpA1 et Shibire^{ts} sont deux gènes rapporteurs employés dans le cadre de la modification de l'activité neuronale, et permettent respectivement l'activation ou l'inactivation de neurones cibles de façon thermosensible.

Originellement, dTrpA1 est un canal ionique thermosensible permettant l'excitation d'un neurone à son ouverture, notamment exprimé dans les neurones dédiés à la thermoception (Hamada et al., 2008). L'ouverture du canal commence autour de 25°C mais est optimal autour de 29°C (Hamada et al., 2008). En exploitant cette caractéristique, il est alors possible de forcer l'activation d'un neurone en lui faisant exprimer dTrpA1 et en le soumettant à une température élevée (Alekseyenko et al., 2010; Kiya et al., 2014; Palavicino-Maggio et al., 2019). Le canal reste ouvert aussi longtemps que la température est élevée, impliquant toutefois une certaine forme d'inertie dans son ouverture et fermeture. Cette particularité est à garder à l'esprit puisque toutes les activations neuronales par dTrpA1 adoptent plutôt une forme tonique que phasique au contrôle temporel assez relatif.

Pour ce qui est de l'induction d'inhibition de l'activité neuronale, nous avons utilisé Shibire^{ts}. Son histoire est plus ancienne puisque ses capacités potentiellement inhibitrices sont connues depuis 1973 (Grigliatti et al., 1973). Son mécanisme d'action n'a été compris que 10 ans plus tard (Kosaka & Ikeda, 1983), et exploité avec le système UAS/GAL4 encore près de 20 ans après (Kitamoto, 2001). En quelques mots, *shibire* est un gène codant pour la dynamine, une protéine permettant l'endocytose et le recyclage des vésicules synaptiques (Kitamoto, 2001; Kosaka & Ikeda, 1983). Shibire^{ts} est une version thermosensible, dont l'activité de transcription est altérée au-delà d'environ 29°C. Le recyclage synaptique est impossible au-delà de cette température. Sans ce recyclage, toutes les vésicules du neurone se déplètent sans pouvoir être remplies de nouveau, menant *in fine* à l'inhibition du neurone par défaut de transmission.

3.2.3. La modulation d'expression géniques : les ARN interférents et les séquences codantes

L'usage des ARN interférents (ARNi) rend possible la répression de l'expression de protéines dans une cellule. Dans des conditions normales, la synthèse de protéine commence par la transcription de sa séquence codante d'ADN en ARN messager (ARNm). L'ARNm est alors le brin complémentaire de la séquence codante d'ADN, quitte le noyau, puis subit une traduction pour constituer la protéine en elle-même. Le ARNi consiste en une séquence de nucléotides capable de se lier avec l'ARNm. La liaison ARNi-ARNm bloque la traduction et induit la destruction de l'ARNm, réduisant le nombre de protéines exprimées (Orfanos, 2008).

Les premières utilisations des ARNi remontent aux années 1980 avec les travaux d'Izant et Weintraub sur des cultures de cellules (Izant & Weintraub, 1984). Cette technique a ensuite été développée pour être expérimentée chez le vivant (Fire et al., 1998). Aujourd'hui, il est possible de coupler les séquences codantes des ARNi avec le complexe UAS/GAL4 pour exprimer des ARNi dans les cellules cibles. Des ressources telles que des banques de ARNi comme la *Bloomington Drosophila Stock Center* ou la *Vienna Drosophila Resource Center* (VDRC) sont à disposition pour quiconque souhaite les utiliser dans ses études (Dietzl et al., 2007; Nishihara et al., 2004; Orfanos, 2008).

Inversement, il est possible de sur-exprimer une protéine dans le but d'étudier son rôle. Pour ce faire, une séquence codante de la protéine à sur-exprimer est associée à la séquence UAS. Dans ce cas, la régulation de l'expression de la protéine ne dépendra plus de la machinerie cellulaire interne, mais du facteur de transcription GAL4.

3.3. Les comportements de la drosophile

Nous avons utilisé ces outils et techniques dans le but de modifier le fonctionnement du cerveau de la drosophile et constater les conséquences sur le comportement. Nous développerons dans cette section la façon de tester les comportements sociaux de la drosophile, ainsi que leur éthogramme.

3.3.1. Les comportements agressifs

3.3.1.1. Les tester en laboratoire

Chez les drosophiles, le comportement agressif est connu depuis presque aussi longtemps que ces insectes sont devenus des modèles d'études en génétique. Les premiers écrits mentionnant des interactions agressives sont ceux de Sturtevant qui décrivait des comportements de cour de *Drosophila ampelophila*, un nom synonyme de *melanogaster* (Prigent & Rajpurohit, 2007; Sturtevant, 1915). Les premières études des comportements agressifs en tant que telles remontent à Dow et von Schilcher en 1975 (Dow & Schilcher, 1975). Dans cette étude, ils observaient déjà 3 différentes intensités d'agressivité : des menaces, des charges rapides et de la boxe. Les drosophiles mâles étaient testées en groupe de 6 et placées dans une arène de 7cm de diamètre sur 4cm de haut avec au centre un patch de nourriture de 2.5cm de diamètre. Des femelles vierges étaient ensuite insérées dans l'arène et les interactions agressives et reproductives ont été analysées. Sans grande surprise, le gagnant, *i.e.* le mâle qui demeurait sur le patch, avait un meilleur accès aux femelles. Ce succès est lié au fait que le mâle défend une ressource intéressante pour la femelle qui va donc être plus encline à se reproduire avec le gagnant.

Sur cette base, Hoffmann et Cacoyianni se sont intéressés à la territorialité des mâles (Hoffmann, 1987, 1990; Hoffmann & Cacoyianni, 1989, 1990). Ils ont montré que la territorialité variaient d'une espèce à l'autre (en l'occurrence entre *melanogaster* et sa proche cousine *simulans*) (Hoffmann, 1987). Le territoire était ici une coupe de nourriture de 2cm de diamètre sur 1.2cm de haut, placé dans les arènes décrite par Dow et von Schilcher. Les mâles étaient testés en groupe, en compétition pour ce territoire et des femelles non vierges, pour limiter les interférences des comportements reproducteurs, ajoutaient de la valeur à celui-ci. Ils ont ainsi montré 1) une influence génétique sur ces comportements en procédant à des sélections, ne faisant se reproduire que les gagnants des combats précédents et en les comparant à des lignées non sélectionnées (Hoffmann & Cacoyianni, 1989), et 2) que l'agressivité territoriale de *D. mel* n'intervenait que dans des conditions où la drosophile estime avantageux de posséder et défendre un territoire (Hoffmann & Cacoyianni, 1990).

INTRODUCTION

Au début des années 2000, l'un des travaux pionnier dans le domaine a été celui de Chen et collaborateurs en 2002 (Chen et al., 2002). Ils y ont décrit un protocole expérimental plus simple que ceux utilisés plus tôt (**Tableau 2**), ainsi qu'un éthogramme que nous détaillerons juste après. Leur protocole implique une arène carrée et presque deux fois plus petite : 3.75cm de côté pour 2.5cm de haut. La coupe de nourriture servant de territoire a aussi été rétrécie, passant à 1.5cm de large pour 1cm de haut. L'attractivité du territoire était renforcée à l'aide de 3 éléments : une goutte de jus de pomme déposée à la surface, de la lumière concentrée sur le territoire (les drosophiles étant attirées par la lumière), et une femelle non vierge décapitée placée sur le territoire. Les drosophiles y sont désormais testées par pair et la durée d'observation est passée à 30min, là où les observations d'Hoffmann, et de Dow et von Schilcher pouvaient durer jusqu'à plusieurs heures. Enfin, les drosophiles étaient âgées d'une semaine là où elles étaient plutôt âgées de 3 jours chez les études précédemment citées et étaient toutes placées en isolement dès l'éclosion de la puppe jusqu'au jour de test. Ce protocole est une référence dans le domaine et a été largement utilisé dans les laboratoires.

Tableau 2 : Les différentes conditions de test du comportement agressif

AUTEURS	Taille et âge du grp de mâles	Taille de l'arène	Taille du territoire / patch	Ressources contestées	Temps d'observation
Dow & von Schilcher, 1975	6 mâles âgés de 3-4 jours	7cm diam. 4cm haut.	2.5cm diam.	Nourriture standard + femelle vierge	3 heures + 50min avec femelle vierge
Hoffmann, 1987	6 mâles âgés de 3-4 jours	10cm diam. 4cm haut.	2cm diam. 1.2cm haut.	Nourriture standard + levure	8 heures
Chen et al., 2002	2 mâles âgés de 7 jours	3.75cm côté, 2.5cm haut	1.5cm diam. 1cm haut.	jus de pomme + femelle non vierge + lumière	30 minutes

Finalement, nous constatons ici que malgré quelques études relativement anciennes du comportement agressif, son étude « moderne » n'a commencé qu'il y a une vingtaine d'années. Par conséquent, même si les travaux de Chen *et al.* ont posé des bases solides, il demeure des différences de protocoles selon les laboratoires. Par exemple, dans la manipulation des drosophiles : certaines études vont placer les drosophiles dans les arènes par aspiration (Agrawal et al., 2020; Chen et al., 2002), et d'autres par géotaxie négative (Chowdhury et al.,

INTRODUCTION

2017; Prunier & Trannoy, 2024). Cette différence n'est pas anodine car elle impacte directement le comportement agressif observé (Trannoy et al., 2015). D'autres vont différer dans le scoring, certains utilisant des logiciels automatiques comme CADABRA (Agrawal et al., 2020; Asahina et al., 2014) quand d'autres scorent manuellement (Chowdhury et al., 2017; Prunier & Trannoy, 2024). Il peut y avoir aussi des différences dans les températures d'élevage, certaines étant à 19°C puis 25°C (Chowdhury et al., 2017), d'autres à 22°C ou 25°C (Asahina et al., 2014) et des températures de tests pouvant également varier entre 20, 25, 28 ou 30°C selon les géotypes (Prunier & Trannoy, 2024; Sengupta et al., 2022). Les périodes d'analyse peuvent aussi varier de 30 min dès le début de l'enregistrement (Sengupta et al., 2022), à partir du moment où les deux mâles sont sur le patch de nourriture (Vrontou et al., 2006), après la première attaque (Sherer et al., 2020) pendant 20 min (L. Wang & Anderson, 2010), 10 min (Zhou et al., 2008) ou 5 min (Prunier & Trannoy, 2024; Ueda & Kidokoro, 2002), avec des temps d'habituation qui peuvent aussi varier entre 10 et 30 min (Prunier & Trannoy, 2024; Zhou et al., 2008). Ainsi, même si les études dans le domaine s'accordent sur les bases de Chen *et al.*, de nombreuses et notables différences dans les protocoles expérimentaux existent.

3.3.1.2. Ethogramme

En un siècle, l'éthogramme du comportement agressif de la drosophile a été précisément décrit. Dans les premières descriptions qui ont été faites, Dow et von Schilcher ne distinguaient que 3 comportements : 1) les menaces d'ailes (*wing threat* ou WT) décrites comme une levée des deux ailes, 2) les attaques (*quick charge*) décrites comme une levée sur ses pattes arrières avant de frapper l'adversaire et 3) de la boxe (*boxing*) décrite comme étant des variations de « taillades » et de frappes très vigoureuses des pattes avant, avec les deux opposants sur leur pattes arrière (Dow & Schilcher, 1975). Hoffmann avait étoffé cet éthogramme avec une dizaine d'autres comportements pour étudier la territorialité (Hoffmann, 1987).

Néanmoins, comme mentionné plus tôt, les études actuelles se réfèrent à la méthodologie et à l'éthogramme de Chen et collaborateurs (Chen et al., 2002) pour analyser les comportements agressifs. Ils en décrivent ainsi 9 actions offensives auxquels s'ajoute 4 défensives dans l'ordre croissant d'intensité résumé dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**) :

INTRODUCTION

Tableau 3 : Ethogramme des comportements agressifs de la drosophile, adapté de Chen et al., 2002

COMPORTEMENT	DESCRIPTION
<i>Actions offensives</i>	
Approche	Une mouche abaisse son corps et s'avance vers l'adversaire
Barrage de basse intensité	Chaque mouche étend une patte et touche la patte de l'adversaire
Menace d'ailes (<i>Wing threats</i>)	Une mouche lève rapidement ses deux ailes à 45° de son corps vers son adversaire
Barrage de haute intensité	Une ou les deux mouches se font face, étendent leurs pattes devant et poussent l'adversaire
Poursuite	Une mouche cours après l'autre
Charge (<i>Lunge</i>)	Une mouche se lève sur ses pattes arrière et retombe sur l'adversaire
Maintien	Une mouche attrape l'adversaire avec ses pattes avant et tente de l'immobiliser
Boxe (<i>Boxing</i>)	Les deux mouches se lèvent sur leurs pattes arrière et frappent l'adversaire avec leurs pattes avant
Lutte	Les deux mouches tombent l'une sur l'autre, au point parfois de quitter le territoire
<i>Actions défensives</i>	
Fuite lente	Le perdant se retourne et fuit lentement face à l'avancée du gagnant
Menace d'ailes défensive	Le perdant déploie ses ailes à 45° tout en fuyant l'adversaire
Fuite rapide/est poursuivie	Le perdant fuit rapidement face à l'avancée du gagnant
Fuite par envol	Le perdant quitte le territoire

Dans cet éthogramme qui reprend en partie les observations de Dow, von Schilcher et Hoffmann, nous retiendrons principalement le *lunge* et le *boxing*, en gras dans le tableau 3. Nous considérerons le nombre de *lunges* comme marqueur représentatif de l'agressivité, et le nombre de *boxing* comme marqueur d'une agressivité dérégulée des drosophiles.

Sur la base de ces différents comportements, il est possible d'extraire d'autres mesures. Par exemple, la latence d'attaque, généralement définie comme le temps entre la première rencontre et la première attaque, reflète la motivation des mouches à combattre. Les comportements les plus fréquemment étudiés sont les *lunges* (=marqueurs d'agressivité normale), les *boxes* (=marqueurs d'agressivité outrée), et dans une moindre mesure les menaces d'ailes

INTRODUCTION

(=marqueurs d'agressivité faible). On peut envisager d'analyser ces comportements sous deux angles : soit en nombre d'événement comme nous l'avons fait, soit en durée (**Fig. 5**).

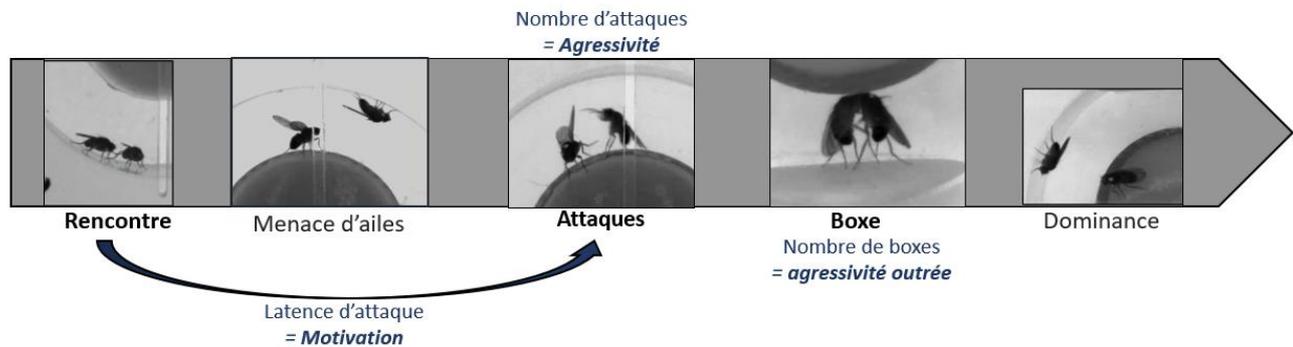


Figure 5 : Dynamique des combats entre mâles *D.melanogaster*

Les individus se rencontrent en se touchant par leurs pattes. La compétition commence généralement sur des menaces d'ailes, avant d'escalader en attaques (*lunges*) et sont souvent données par la même drosophile. Parfois, le combat peut escalader encore en phénomènes de boxe. La répétition des attaques engendre de la dominance entre les deux individus. En noir et en gras sont reportés les comportements que nous exploiterons (rencontre, attaques et boxe). En bleu foncé sont reportés les interprétations de ces comportements.

Notons par ailleurs que mâles et femelles diffèrent dans l'expression de l'agressivité. En effet, Chen *et al.* ont reporté que les mâles présentaient des comportements agressifs de plus haute intensité (*lunges*) par rapport aux femelles qui se limitent souvent au barrage, et utilisent des attaques de moins grande intensité appelées coups de tête (*head butts*). Cette différence est majeure car les *lunges* permettent de sortir l'adversaire du territoire et ainsi d'établir une dominance entre les mâles, alors que les coups de tête ne permettent pas d'établir de dominance entre les femelles (Chen *et al.*, 2002; Kravitz & Fernandez, 2015; Ueda & Kidokoro, 2002; Vrontou *et al.*, 2006). Cependant, chez les femelles, il a été montré que l'activation de certains neurones cholinergiques induisait une agressivité plus élevée, se traduisant par un nombre beaucoup plus grand d'attaques mais ne menant pas à des phénomènes de boxe comme observés chez les mâles (Palavicino-Maggio *et al.*, 2019). Par contre, « féminiser » les neurones cholinergiques des mâles induit plus de phénomènes de boxe (Mundiyanapurath *et al.*, 2009). De plus, « masculiniser » certains neurones chez les femelles induit des *lunges* (comportement mâle-spécifiques), démontrant que les patterns agressifs de la drosophile sont dépendant d'un fonctionnement neuronal sexe-spécifique (Monyak *et al.*, 2021). Ces neurones sexe-spécifiques sont définis par l'expression ou non de gènes comme *fruitless (fru)* et/ou *doublesex (dsx)*. Ces gènes sont impliqués dans le dimorphisme sexuel, se traduisant par un dimorphisme anatomique et comportemental (Arthur *et al.*, 1998; Mundiyanapurath *et al.*, 2009; K. Sato & Yamamoto, 2020; Yamamoto & Kohatsu, 2017), notamment visibles sur les comportements agressifs

INTRODUCTION

(Vrontou et al., 2006). Les mâles par exemple expriment la forme mâle de *fru*, noté Fru^M. Il existe aussi des gènes propres aux femelles comme *transformer (tra)* noté tra^F (Y.-B. Chan & Kravitz, 2007). Masculiniser ou féminiser des neurones revient à exprimer ou réprimer l'expression de ces gènes dans ces neurones.

3.3.2. Les comportements reproducteurs

3.3.2.1. Les tests en laboratoire

Les tests des comportements de cour et reproducteur consistent à placer un mâle et une femelle ensemble dans une arène carrée ou circulaire similaires à celles utilisées pour l'agression mais sans ajout de ressources supplémentaires (Von Philipsborn et al., 2023). La phase d'observation peut être assez courte pour les comportements pré-copulatoires (~10 min) (Nichols et al., 2012).

3.3.2.2. Ethogramme

Nous avons décrit les travaux de Sturtevant comme premières traces écrites des comportements agressifs chez la drosophile, mais ses travaux portaient originellement sur sa reproduction (Sturtevant, 1915). Ainsi, les comportements reproducteurs qu'il avait rapportés étaient 1) la vibration d'aile, le mâle étend une aile et la fait vibrer, 2) le *circling*, qui est un mouvement semi-circulaire du mâle autour de la femelle souvent fait en parallèle de la vibration, 3) le léchage (*licking*) quand le mâle se déplace à l'arrière de la femelle, lève son abdomen avec sa tête et lèche les parties génitales de la femelle avant de 4) courber son propre abdomen (*abdomen bending*) pour tenter de s'accoupler. Il observait une durée de cour d'environ 20 min avant copulation, et l'accouplement en lui-même durait également 20 min (Sturtevant, 1915).

La séquence de l'accouplement de la drosophile aujourd'hui décrite ressemble énormément à celle de Sturtevant et se découpe en 6 comportements reportés dans l'ordre dans le **Tableau 4** et la **Fig. 6** (Greenspan & Ferveur, 2000; Yamamoto et al., 2014).

INTRODUCTION

Tableau 4 : Ethogramme des comportements de cour de la drosophile, adapté de Yamamoto et al., 2014

COMPORTEMENT	DESCRIPTION
Orientation (<i>circling</i>)	Le mâle décrit un mouvement semi-circulaire autour de la femelle
Tapotement (<i>tapping</i>)	Le mâle tapote l'abdomen de la femelle avec ses pattes avant pour capter les phéromones femelles-spécifiques
Chant (<i>singing</i>) ou Extension Unilatérale de l'Aile (<i>Unilateral Wing Extension</i>)	Le mâle étend une aile à l'horizontale à 90° et la fait vibrer, émettant un chant dont les vibrations transmises par le substrat rendent la femelle réceptive (McKelvey et al., 2021)
Léchage (<i>licking</i>)	Le mâle étend son proboscis vers les parties génitales de la femelle
Tentatives d'accouplement	Le mâle courbe son abdomen et tente de monter la femelle
Copulation	Le mâle a son abdomen courbé et est bien accroché à la femelle

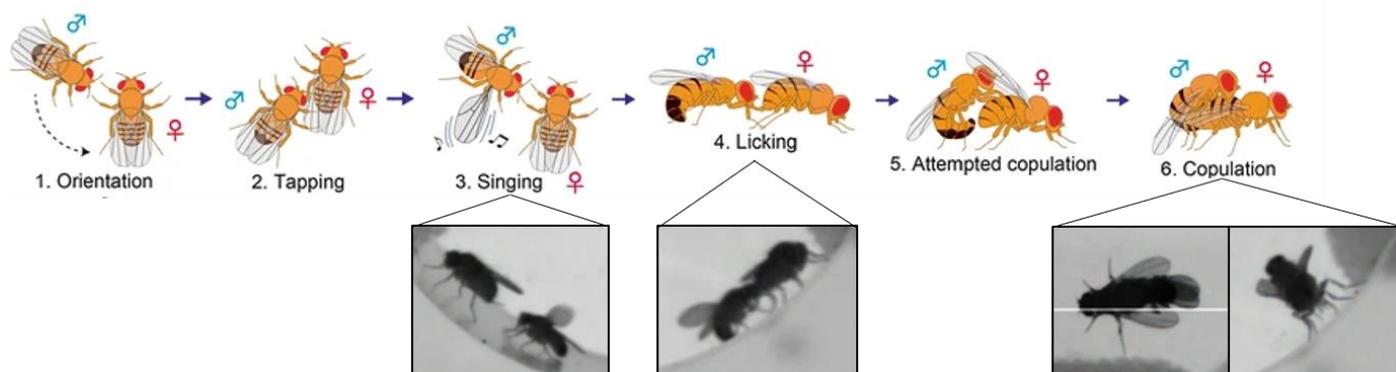


Figure 6 : Rituel des comportements de cour (adapté de Yamamoto, 2014)

Le début de la cour commence par 1) l'orientation du mâle vers l'abdomen de la femelle. Ensuite 2) le mâle tapote la femelle pour l'identifier comme femelle. 3) S'en suit un chant émis par une vibration unilatérale d'une aile du mâle afin de rendre la femelle réceptive à la copulation. 4) Puis le mâle lèche la partie externe génitale de la femelle pour stimuler l'ouverture des voies génitales. 5) Le mâle tente de s'accoupler et 6) la séquence se conclut sur l'acte copulatoire qui dure en moyenne 20mn.

Bien que classiquement les comportements reproducteurs étudiés soient ceux du mâle, la femelle possède également un rôle actif dans ces interactions. Elles sont capables d'accepter ou non l'accouplement en rendant leur abdomen plus ou moins disponible. Il existe par ailleurs un éthogramme répertoriant des comportements faisant surtout référence à la posture de la femelle et de son abdomen, mais que nous ne développerons pas en détails ici (Lasbleiz et al., 2006).

INTRODUCTION

Sur cette base, il est possible de quantifier indépendamment chacun de ces comportements. Toutefois, le calcul d'un index est souvent préféré car il permet de caractériser l'ensemble de la cour d'un individu. On l'appelle généralement Index de Cour (IC), ou Index de Vigueur de Cour (ou *courtship vigor index* CVI). Cette valeur correspond à un ratio entre la somme des temps où le mâle courtise la femelle, et le temps total d'observation avant accouplement (Nichols et al., 2012). D'après Nichols et collaborateur, un IC de référence se situerait entre 0.6 et 0.8, soit entre 60 et 80% du temps du mâle à courtiser avant accouplement, et ce en moins de 5min (Nichols et al., 2012).

3.4. Les phéromones, principal système de communication...

Rappelons-nous de ce qui a été dit au tout début de ce manuscrit : les comportements reproducteurs et agressifs sont considérés comme sociaux, et impliquent un système de communication (Robinson et al., 2008). Nous allons donc aborder ces processus chez la drosophile avec les notions de phéromones et d'hydrocarbures cuticulaires (HC), principaux messagers chimiques employés par la drosophile pour réguler tant l'agressivité que sa reproduction (Dembeck et al., 2015).

3.4.1. ...de l'agressivité : les cas du 7-T et du cVA

Une des principales phéromones impliquées dans l'exécution du comportement agressif a été découverte relativement récemment (Wang & Anderson, 2010). Le cVA (ou 11-*cis*-vaccenyl acetate) est une phéromone mâle-spécifique semi-volatile sécrétée par le bulbe éjaculatoire des mâles (Butterworth, 1969; M. P. Fernández & Kravitz, 2013; Wang et al., 2011). Sa volatilité demeure néanmoins plutôt faible puisqu'il est capté au plus loin à environ 5 mm de distance (Taisz et al., 2023). Il est détecté par les neurones olfactifs possédant le récepteur Or67d qui se situent au niveau des sensilles (les « poils ») des antennes (Ziegler et al., 2013). L'activation de ces neurones, induite artificiellement ou par exposition au cVA, génère de l'agression (Ha & Smith, 2006; Wang et al., 2011). Toutefois, lorsqu'elles sont élevés en groupe, les drosophiles mâles vont montrer une agressivité diminuée (Liu et al., 2011). Ces auteurs montrent que cela est due à une exposition chronique au cVA qui active un second récepteur olfactif, Or65a, pour diminuer l'agressivité. En effet, sans ce récepteur, l'effet inhibiteur du groupe sur l'agressivité disparaît (Liu et al., 2011). Or, le cVA est une phéromone

INTRODUCTION

qui permet de répartir les individus dans l'espace en plus d'engendrer de l'agressivité. En effet, déposer du cVA sur un patch de nourriture amène les drosophiles à se disperser de la ressource et à combattre plutôt qu'à s'agréger autour d'elle (Wang & Anderson, 2010). Par conséquent, le rôle du cVA pourrait être double : son exposition aïgue promeut l'agressivité des mâles, alors que son exposition chronique permet de répartir les individus autour d'une ressource (Fernández & Kravitz, 2013). Nous retrouvons bien là deux des fonctions principales de l'agressivité : 1) faire cesser toutes interférences d'un autre sur ses comportements, et 2) distribuer les individus dans l'espace (Lorenz, 1969; Tinbergen, 1968).

Le 7-tricosene (7-T) est un hydrocarbure cuticulaire (HC) non volatile, synthétisé par les oenocytes (Dembeck et al., 2015). Sa détection ne se fait que par contact, impliquant le système gustatif et le récepteur Gr32a (Miyamoto & Amrein, 2008; Wang et al., 2011). Le 7-T a des rôles semblables au cVA et évoque un comportement agressif chez des drosophiles « parfumé » à cet HC et dépourvues d'oenocytes, (Wang et al., 2011). Cette même étude dissocie l'effet du cVA et du 7-T sur l'agressivité. En effet, là où le 7-T seul peut induire de l'agressivité, le cVA nécessite une activité des récepteurs gustatifs du 7-T, Gr32a, pour induire cette agressivité.

Il est tout à fait probable que la reconnaissance du sexe des conspécifiques, et donc du choix du comportement à adopter, passe entre autres par des indices chimiques (Vilella & Hall, 2008). Le cVA, par sa nature mâle-spécifique, est probablement l'un des principaux acteurs de cette reconnaissance (Antony & Jallon, 1982; Fernández & Kravitz, 2013). De plus, l'androgénisation du profil cuticulaire des femelles conduit les mâles à les attaquer au lieu de les courtiser (Fernández et al., 2010). Cette même étude a également montré que les mâles répondaient à l'agressivité des femelles montrant un pattern agressif masculin. Cela suggère que d'autres indices comportementaux peuvent entrer en ligne de compte comme des indices visuels ou auditifs (Deutsch et al., 2019; Fernández et al., 2010; Greenspan & Ferveur, 2000).

3.4.2. ...de la reproduction : des inhibiteurs et des promoteurs

Nous venons de mentionner deux phéromones mâle-spécifiques, le 7T et le cVA, comme étant promoteurs des comportements agressifs. Il s'avère qu'en plus de cette fonction, ceux-ci sont capables d'inhiber les comportements reproducteurs. Généralement, ceux-ci sont transmis du mâle à la femelle pendant l'accouplement (Butterworth, 1969), mais le cVA a des effets sexe-dépendant. D'une part, le cVA rend les femelles moins réceptives aux avances des mâles (Laturney & Billeter, 2016). Notons par ailleurs que d'autres HC remplissent spécifiquement

INTRODUCTION

cette fonction inhibitrice, comme le CH503 capable d'agir sur le long terme (Yew et al., 2009). Toutefois, le cVA, associé au 7-T, leur sert ultérieurement d'indice pour choisir leur site de ponte, de façon dose dépendante et suivant une courbe en cloche où seule une concentration intermédiaire est attractive en activant les récepteurs Or67d et Or65a (Verschut et al., 2023). Ce même travail indique qu'une forme oxydée du 7-T, l'heptanal, peut également jouer ce rôle, auquel cas cet effet est médié par les récepteurs Or13a, Or22a, Or35a, Or67b et Or69a. Il assumerait selon les auteurs tant le transfert d'une information sociale (*i.e.* présence récente de congénères) que nutritionnel car l'heptanal est aussi retrouvé dans les fruits. D'autre part, chez les mâles, le cVA inhibe l'expression de comportements de cour probablement par son effet pro-agressif (Ha & Smith, 2006; Kurtovic et al., 2007; Lacaille et al., 2007; Lee & Wu, 2020; Wang et al., 2011). Ces effets passent par les mêmes récepteurs, Or67d pour le cVA et Gr32a pour le 7-T. (Kurtovic et al., 2007; Miyamoto & Amrein, 2008; Wang et al., 2011). Ces différences observées chez les femelles et les mâles soulignent une fois de plus le dimorphisme sexuel (Salzberg et al., 2023).

A l'inverse certaines phéromones aphrodisiaques peuvent promouvoir le comportement reproducteur, telles que deux HC femelles spécifiques : le (Z,Z)-7,11 heptacosadiene capté par les récepteurs ppk23, ppk25 et ppk29 (T. Liu et al., 2020) et le (Z,Z)-7-11 nonacosadiene (Antony et al., 1985; Fernández et al., 2010). Ces phéromones induisent des comportement reproducteurs des mâles envers les femelles (Ferveur & Sureau, 1996).

3.4.3. Intégration des signaux

Nous avons vu que les phéromones chez la drosophile peuvent être de deux natures selon leurs propriétés chimiques. Les volatiles sont transmises par voie aérienne et détectées par le système olfactif ; alors que les phéromones de contact sont détectées par le système gustatif (Fernández & Kravitz, 2013).

3.4.3.1. Le système olfactif

Dans le principe, la façon dont les signaux olfactifs sont intégrés est partagé chez la plupart des insectes étudiés, dont la drosophile (**Fig. 7**). D'abord, les neurones sensoriels olfactifs (NSO, ou OSN pour *olfactory sensory neurons*) situés au niveau des sensilles des antennes permettent de capter les odorants (Zhao & McBride, 2020; Ziegler et al., 2013). Tous les NSO

INTRODUCTION

n'expriment pas les mêmes récepteurs olfactifs et seront réceptifs qu'à certaines odeurs. L'information captée est ensuite transmise aux lobes antennaires (LA) qui est la région sensorielle primaire de l'olfaction. Le LA est subdivisé en populations de neurones appelés glomérules, et chacun d'entre eux reçoit les informations d'un seul type de neurone, *i.e.* un seul type de récepteur, une seule « odeur ». L'activité de ces glomérules est régulée par des interneurons locaux inhibiteurs pour éviter des sources de fortes concentration d'odorant par exemple (Leinwand & Chalasani, 2011). Après ce premier traitement, l'information est principalement relayée à deux aires cérébrales via des neurones des projections : les corps pédonculés (CP, que nous développerons en 3.5.6) pour permettre l'apprentissage et la mémoire, et la corne latérale (CL) impliquée dans le traitement primaire de l'odeur en elle-même (Zhao & McBride, 2020).

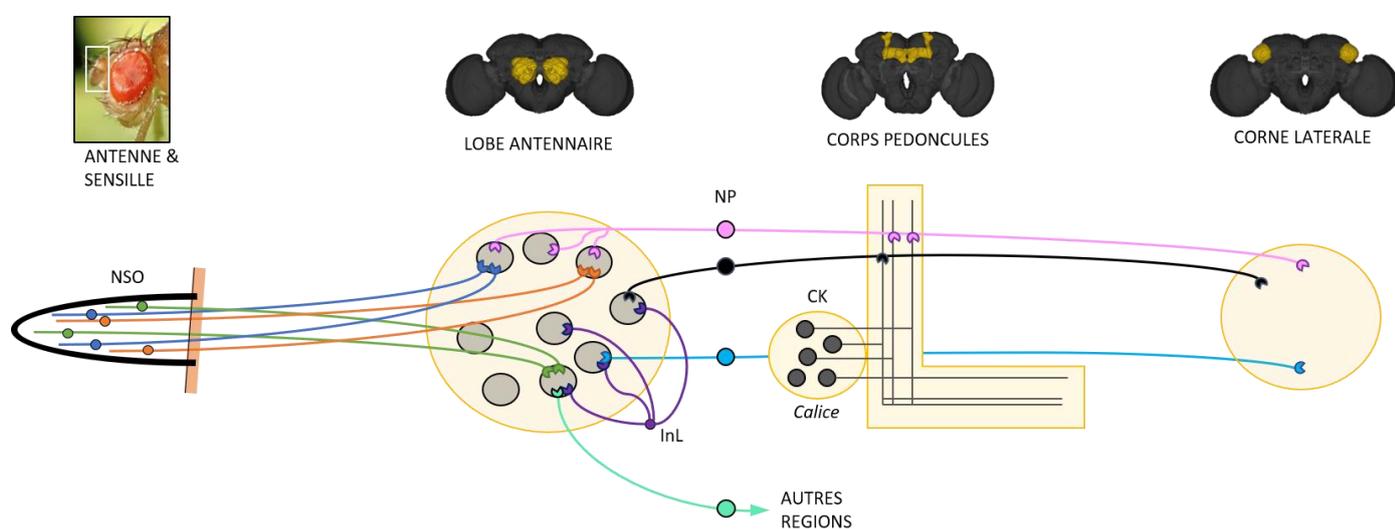


Figure 7 : Schéma du circuit de l'intégration olfactive des odeurs, adapté de Zhao & McBride, 2020

Des neurones sensoriels olfactifs (NSO) présentent à leur surface un seul type de récepteur olfactif qui diffère d'un NSO à l'autre (représenté par les couleurs vert, bleu et orange). Les neurones présentant un même récepteur projettent leur axone dans le lobe antennaire sur un même glomérule (cercle gris clair) chargé de gérer l'information issue de ces neurones. Des interneurons locaux (InL) modulent le signal au niveau des glomérules. Des neurones de projections (NP) vont recueillir l'information d'un (en noir) ou plusieurs (en rose) glomérules pour les transmettre aux corps pédonculés, constitué des dendrites des cellules de Kenyon (CK, gris foncé), ainsi qu'à la corne latérale. Certains de ces neurones de projections vont directement projeter sur la corne latérale (en bleu clair) ou d'autres régions (bleu-vert). Les modèles 3D des régions cérébrales sont issus de virtualflybrain.org.

3.4.3.2. Le système gustatif

Les phéromones de contacts sont détectées en premier lieu par le proboscis et les pattes où sont exprimés des récepteurs gustatifs (Ziegler et al., 2013). Le système gustatif semble moins bien connu que son homologue olfactif, mais il a néanmoins été récemment revu (Scott, 2018). Plusieurs types de récepteurs sont impliqués dans ce système : des récepteurs gustatifs, des

INTRODUCTION

récepteurs ionotropiques, certains récepteurs de la famille ppk et le canal dTrpA1. Cette variété de récepteurs permet une détection et une discrimination plus fine des différents paramètres du goût (sucre, amertume, salinité...), et exprimée par les neurones gustatifs qui se trouvent notamment au niveau des pattes. Ces-derniers vont essentiellement projeter leurs axones dans la corde nerveuse ventrale (CNV), mais une partie d'entre eux projettent également dans le ganglion suboesophagien (GSO), à l'image des neurones gustatifs du proboscis qui y projettent leur axone. Bien qu'il ne soit pas constitué de glomérules proprement dit, le GSO présente une ségrégation spatiale fonctionnelle selon deux critères : le goût et la région dont est issu l'information (pattes, proboscis...) (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004). En effet, deux éléments supportent cette affirmation. D'une part, les neurones gustatifs du proboscis projettent au niveau médian alors que ceux des pattes projettent au niveau dorsal-postérieur. D'autre part, l'amertume est traitée au niveau médian, tandis que le sucre est traité en périphérie du GSO (Thorne et al., 2004; Wang et al., 2004). Comme le lobe antennaire, des interneurons locaux régulent l'activité du GSO. Ils permettent notamment d'inhiber l'activité des neurones détectant le sucre lorsque ceux détectant l'amertume sont actifs, et réciproquement. Puis des neurones de projections vont envoyer l'information du GSO vers différentes régions dont la corne latérale (CL) et les CP, là où sont aussi envoyés les informations olfactives. Le réseau de neurones entre le GSO et les CP demeure toutefois peu connu. Mais Scott rapporte que les odeurs sont capables d'induire une augmentation de l'activité neuronale des CP et des apprentissages basés sur le goût. La valence des aliments ingérés est également détecté car l'ingestion de nourriture sucrée active les neurones dopaminergiques associés à la récompense, et à l'inverse l'amertume active ceux associés à la punition (Scott, 2018). Ainsi, le goût, comme l'odeur, peuvent amener à des apprentissages grâce à des processus similaires que nous détaillerons en au moment d'aborder le fonctionnement des CP.

L'intégration de ces signaux sensoriels issus des phéromones, qu'elles soient volatiles ou de contact, vont engendrer l'expression de comportements spécifiques via l'activation de certaines structures ou réseaux spécifiques. La CL et les LA que nous avons mentionné permettent par exemple l'identification du sexe du partenaire, mais le comportement de copulation dépend de la CNV, au niveau du ganglion abdominal postérieur (Villegla & Hall, 2008). Il en irait de même pour l'agressivité dont les différents comportements semblent dépendre de différentes activités sérotoninergiques que nous allons aborder dès à présent (Asahina, 2017; Johnson et al., 2009).

3.5. Neurotransmission et circuits des comportements sociaux

3.5.1. La sérotonine

Le rôle des monoamines dont la sérotonine (5-HT) a été récemment revu par Asahina (Asahina, 2017). Chez les vertébrés, une augmentation de la 5-HT se traduit par une baisse de l'agressivité, et inversement (Bubak et al., 2020; Miczek et al., 2007; Prasad et al., 2015; Takahashi et al., 2011). Chez la drosophile, il est difficile de dégager un effet général et stable de la sérotonine, comme en témoigne les études contradictoires reportées dans la revue (Asahina, 2017). Mais il semble que les effets observés chez les vertébrés s'inversent chez la drosophile. Une augmentation de l'activité de neurones 5-HT pourraient être impliquée dans l'escalade de l'agressivité, sans pour autant induire des phénomènes de boxe (Alekseyenko et al., 2010; Alekseyenko & Kravitz, 2014). A l'inverse, inhiber l'activité des neurones sérotoninergique inhibe les comportements agressifs de haute intensité (Alekseyenko et al., 2010). Mais il est aussi possible que l'action de la sérotonine sur l'agressivité dépende du récepteur activé et de la région dans laquelle il se trouve. Par exemple, chez la drosophile, une étude pharmacologique a montré que les récepteurs 5-HT₂ impactent les comportements agressifs de haute intensité (*i.e. lunges* et *boxes*) alors que les récepteurs homologues aux 5-HT_{1A} régulent plutôt les comportements agressifs de faible intensité (*i.e. menaces d'ailes* et *barrages*) (Johnson et al., 2009). Cela suggère une ségrégation fonctionnelle dans le déclenchement des comportements agressifs. Les neurones du protocerebrum latéral postérieur (5HT-PLP) sont parmi neurones 5-HT identifiés comme pouvant moduler l'agressivité (Alekseyenko et al., 2014; Palavicino-Maggio & Sengupta, 2022).

Une étude récente de 2019 a montré qu'en plus de sa complexité inhérente à son système, la sérotonine module l'agression en interagissant avec d'autres systèmes. En interagissant avec le GABA, la sérotonine est capable de réduire l'agressivité. En revanche, ses interactions avec l'acétylcholine, qui a entre autre été mis en cause dans l'hyperagressivité des femelles drosophiles, permet au contraire de l'augmenter (Alekseyenko et al., 2019; Mundiyanapurath et al., 2009; Palavicino-Maggio et al., 2019).

Concernant la reproduction, la sérotonine a été montré comme étant impliquée dans la réceptivité des femelles vierges (Ma et al., 2022; Yang et al., 2023) ou encore dans le péristaltisme du conduit éjaculatoire des mâles (Norville et al., 2010). Plus indirectement,

INTRODUCTION

Knapp et collaborateurs ont montré que des mâles n'exprimant pas le transporteur de la sérotonine SERT, ont des comportements reproducteurs dysfonctionnels, suggérant un rôle de la 5-HT dans ces comportements (Knapp et al., 2022). A l'inverse, augmenter l'expression de VMAT, le transporteur vésiculaire des monoamines dont la 5-HT, dans les neurones sérotoninergiques, semble mener à une augmentation de la cour, et les bloquer les altèrent (Chang et al., 2006). Une autre étude a montré toutefois que l'activité des neurones 5-HT du PMP (*Posterior medial protocerebrum*) altérait la réceptivité des femelles et le comportement de cour des mâles (Pooryasin & Fiala, 2015). Les auteurs soulignent que ceux-ci innervent les mAL, des neurones GABA que nous rementionnerons en 3.5.3 car impliqué dans l'agressivité, et certains neurones de sorties des corps pédonculés. Il est donc probable que comme pour l'agression, l'effet de la sérotonine sur la reproduction varie selon le type de récepteur et les régions impliqués.

3.5.2. La dopamine

La dopamine a des effets connus sur l'agressivité des drosophiles. Par exemple, l'activité ou l'inactivité de deux groupes de neurones dopaminergiques (du tritocerebrum T1, et du protocerebrum postérieur median 3 PPM3) ont pour effet d'augmenter l'agressivité (Alekseyenko et al., 2013; Palavicino-Maggio & Sengupta, 2022). Cette relation entre dopamine et agression est assez étonnante et suggère, selon des auteurs, une relation en U qui a toutefois été déjà trouvé chez d'autres espèces (Palavicino-Maggio & Sengupta, 2022).

Pour ce qui est de la reproduction, la revue de Palavicino-Maggio et Sengupta nous rapporte que la dopamine, comme la sérotonine, est impliquée dans la réceptivité des femelles (Palavicino-Maggio & Sengupta, 2022). Chez la femelle, la relation entre dopamine et reproduction pourrait être plus linéaire : une inactivité dopaminergique augmente le taux de copulation, et une forte activité dopaminergique l'inhibe au contraire (Ishimoto & Kamikouchi, 2020). Ces mêmes auteurs ont montré que l'activité des PPM3, les mêmes que ceux impliqués dans l'agressivité, ont la capacité de moduler la réponse des femelles à la cour des mâles par interaction avec des circuits GABA et cholinergiques (Ishimoto & Kamikouchi, 2020; Palavicino-Maggio & Sengupta, 2022). Toutefois, les projections responsables de la modulation des PPM3 sur les comportements reproducteurs sont différents car les auteurs suggèrent que ce sont les projections avec le protocerebrum médian supérieur (SMP), région

INTRODUCTION

déjà impliquée dans la reproduction en lien avec la dopamine, qui en sont responsables (Ishimoto & Kamikouchi, 2020; Zhang et al., 2016).

Enfin, notons que la dopamine joue un rôle central dans l'apprentissage et les comportements motivés. L'activité de DAMB (récepteur à la DA) dans les CP régulerait à la fois la mémoire et la prise alimentaire induite par le processus de mémoire à long terme induite par l'activité des PPL1-01, une sous-population des neurones PPL1 (Plaçais et al., 2017). Les PPL1 sont des DAN (*Dopaminergic neurons*) et ont un rôle dans le fonctionnement des CP. Nous les détaillerons à la partie 3.5.6.1. Mentionnons dès maintenant que les DAN modulent l'activité des cellules de Kenyon des corps pédonculés, une structure qui nous intéressera particulièrement dans nos expériences (Ichinose et al., 2017). Ainsi, un rôle de la dopamine au travers des apprentissages, des expériences vécues par exemple, pourrait tout à fait être envisageable dans le cadre de la modulation du comportement agressif.

3.5.3. Le GABA

Nous avons déjà mentionné l'action du GABA sur l'agressivité par sa modulation par d'autres systèmes comme la sérotonine (Alekseyenko et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs démontrent que l'activité des neurones GABAergique du protocerebrum ventrolatéral (VLP) inhibe l'agression, et que la neurotransmission GABAergique est nécessaire pour réguler l'activité des neurones cholinergiques qui, eux, augmentent l'agressivité, notamment au travers des récepteurs GABA Rdl exprimés à la surface de ces derniers (Alekseyenko et al., 2019).

En comparant le transcriptome d'une lignée de drosophiles hyperagressives Bully et de lignées contrôles par RNA-seq notamment, Chowdhury et collaborateurs ont montré que le gène CG13646 était sous-exprimé chez les Bully (Chowdhury et al., 2017; Penn et al., 2010). Ce gène est prédit pour être impliqué dans le transport de GABA d'après la base de données génomique flybase (Öztürk-Çolak et al., 2024). En l'occurrence, la réduction de l'expression de ce transporteur par ARNi dans l'ensemble du système nerveux augmente l'agressivité à un niveau similaire à celui observé dans les lignées Bully. A l'inverse, surexprimer ce gène réduit la motivation des drosophiles à attaquer (Chowdhury et al., 2017). Notons que cette étude a également montré qu'une mutation dans ce gène CG13646 à l'état homozygote induisait de lourds déficits moteurs, ce qui suggère un rôle plus large de ce transporteur que la simple régulation du comportement agressif.

INTRODUCTION

Néanmoins, l'action inhibitrice du GABA ne mène pas systématiquement à une diminution de l'agressivité. Une étude récente a par exemple montré que les neurones GABA et sexuellement dimorphiques mAL, sensibles aux phéromones, augmentent l'agressivité lorsqu'ils sont actifs, et leur inactivité l'inhibe. Cette inactivité augmente par ailleurs la cour entre mâles, suggérant un rôle des mAL dans les comportements de cour (Sengupta et al., 2022). Les auteurs précisent que ces neurones, situés proches des lobes antennaires, reçoivent des informations du protocerebrum latéral supérieur (SLP) et les transmettent au GSO. Cela suggère une potentielle modulation par les entrées olfactives et gustatives, autrement dit par les phéromones. En effet, les mAL jouent un rôle dans la bonne identification des partenaires, expliquant pourquoi leur inhibition augmente les comportements de cour entre mâles (Sengupta et al., 2022; Villella & Hall, 2008). Ils reçoivent également des informations gustatives issues des neurones exprimant le récepteur ppk25 impliqué dans la détection de phéromone aphrodisiaque, ce qui leur permet de moduler l'activité de cour (Clowney et al., 2015; Liu et al., 2020). Plus précisément, les mAL joueraient un rôle de bascule entre agressivité et cour en agissant sur les neurones P1 (Lee & Wu, 2020). Une seconde étude a montré néanmoins que ce rôle des mAL est complété par un second groupe de neurone GABAergique, les LC1 (Koganezawa et al., 2016). Dans cette étude cependant, l'activation des mAL n'augmente pas l'agressivité. Selon Sengupta, ces différences pourraient être dues à de légères différences dans les outils génétiques employés. En effet, les promoteurs associés au GAL4 diffèrent entre les deux travaux, et ne ciblent pas les mAL exactement de la même façon. Les deux études s'accordent *a minima* sur le fait que le GABA influence la décision de l'utilisation des séquences agressives ou de cour.

L'action du GABA permet également de moduler l'agressivité en fonction de l'expérience sexuelle des mâles. Des mâles ayant copulé la veille d'un combat, ou ayant été en contact physique avec une femelle montrent moins d'agressivité, alors que des mâles vierges ou sans contact physique sont plus agressifs en présence d'une femelle (Yuan et al., 2014). Les neurones impliqués ici sont les d5-HT1B⁺ et agissent sur leurs partenaires synaptiques via le récepteur Rdl pour réguler l'agressivité, comme les neurones VLP mentionnés précédemment (Alekseyenko et al., 2019; Yuan et al., 2014).

Les neurones GABA de la CNV exprimant *fruitless*, ont eux, été impliqués dans la régulation de différents comportements de cour, via le récepteur Rdl (Amin et al., 2023). Lorsque ces neurones sont inhibés, la cour des mâles est sévèrement déficiente, notamment les

INTRODUCTION

vibrations d'ailes et les tentatives d'accouplement. De la même façon, il a récemment été montré que les neurones GABA de la CL relaient des informations sur la satiété qui agissent sur les neurones pC1, connus comme étant un centre décisionnel des comportements motivés (*i.e.* cour et agression), via le récepteur Rdl pour réduire la réceptivité des femelles à la cour des mâles lorsque celles-ci ont faim (Lee & Wu, 2020; Sun et al., 2023).

Dans cette thèse, nous nous intéresserons à un neurone GABAergique en particulier : le *Mushroom Body Output Neuron 11* (MBON-11). Nous développerons plus en détails les rôles du MBON-11 en 3.5.6 lorsque nous aborderons la structure des CP. Mais soulignons dès à présent que bien qu'il n'ait pas été impliqué dans les comportements agressifs ou reproducteurs directement, il permet d'attribuer des valences aux stimuli, y compris des expériences de combats, et de réguler leur approche ou leur évitement (Kim et al., 2018; Perisse et al., 2016).

3.5.4. L'octopamine, le glutamate et l'hypothèse de la double transmission

3.5.4.1. L'octopamine et le glutamate dans les comportements sociaux

Selon la revue d'Asahina, l'effet de l'octopamine (OA) semble encore assez flou et mal compris (Asahina, 2017). Ce qui semble en revanche ressortir, et l'auteur le souligne lui-même, c'est que la restriction de la transmission OA a une meilleure congruence des résultats que son activation qui aboutit à peu d'effet. Ainsi, plusieurs études ont montré que réduire l'activité des neurones OA aboutit généralement à une baisse de l'agressivité mais elle s'associe à une dérégulation des comportements de cour mâle-mâle qui sont plus fréquents (Hoyer et al., 2008; Sherer et al., 2020; Zhou et al., 2008). Notons que les études réduisent la transmission OA en supprimant l'expression de son enzyme de synthèse : la Tyramine- β -hydroxylase (T β h). Par conséquent, la quantité de précurseur de l'OA, la tyramine, pourrait tout aussi bien être la cause de la réduction de l'agressivité. L'étude d'Hoyer exclut l'hypothèse du rôle de la tyramine en testant notamment des mutants n'exprimant pas la Tyrosine decarboxylase 2 (Tdc2), enzyme synthétisant la tyramine grâce à la tyrosine. Ces mutants Tdc2, qui ont donc des faibles taux de tyramine et d'octopamine, ont présenté une agressivité tout aussi réduite que ceux n'exprimant pas la T β h (Hoyer et al., 2008).

La dérégulation de la cour induite par la réduction de l'activité des neurones OA suggère que l'OA régule les comportements reproducteurs des drosophiles. L'OA permet notamment l'ovulation et le déclenchement des comportements post-accouplement normaux des femelles,

INTRODUCTION

tel que le rejet des mâles (Krupp & Levine, 2014). De plus, l'OA intervient dans la régulation et le choix de la stratégie agressive ou reproductive des drosophiles grâce aux connections de 3 neurones OA avec les neurones Gr32a qui captent certaines phéromones sexuelles comme le 7-T (Andrews et al., 2014).

Si l'on regarde les études sur le lien entre glutamate et agressivité, les preuves directes sont peu nombreuses. Une étude pointe le rôle du récepteur glutamatergique NMDAR1 dans l'agressivité (Zwarts et al., 2011). Néanmoins de récents travaux montrent que les récepteurs NMDAR dans les CP n'ont pas d'effet sur l'agressivité, alors que mGluR dans les CP semblent réguler l'intensité des combats (Delescluse, 2024).

A ma connaissance bibliographique, peu de travaux semble impliquer le glutamate dans la reproduction. Une étude montre que le récepteur olfactif IR84a, qui fait partie des récepteurs glutamate chemosensoriels ionotropiques mais sur lequel ce-dernier n'a aucun effet, montre des effets sur l'attractivité des individus (Grosjean et al., 2011). Une seconde étude a mis en évidence le rôle d'une population de neurones glutamatergiques dans le ganglion abdominal postérieur, au niveau de la CNV, permettant de déclencher les comportements de copulations (Pavlou et al., 2016).

3.5.4.2. Le processus de double transmission et les neurones VPM4

Il a été récemment montré par Sherer et collaborateurs en 2020 qu'environ 70% des neurones OA expriment à la fois le transporteur vésiculaire des monoamines VMAT, et le transporteur vésiculaire du glutamate, dVGLUT (Sherer et al., 2020). Autrement dit, près de trois quarts des neurones OA seraient capables de relarguer à la fois de l'OA et du glutamate. Ils ont alors démontré que diminuer le relargage du glutamate des neurones OA réduit spécifiquement l'agressivité, là où la réduction du relargage de l'OA réduit l'agressivité mais augmente la cour entre mâles (Sherer et al., 2020). Ce *dual-neurotransmitting processes*, ou processus de double neurotransmission a déjà été démontré chez les mammifères, où la présence de VGLUT a été mis en évidence dans des populations dopaminergiques, sérotoninergiques ou GABAergique (El Mestikawy et al., 2011). Fonctionnellement, ce processus de double neurotransmission permet d'aboutir à 4 modes de libération selon El Mestikawy *et al.* Les propriétés associées à chaque mode de libération augmentent considérablement l'action possible de ces neurones au sein des circuits neuronaux. L'importance fonctionnelle des neurones à

INTRODUCTION

double neurotransmission va au-delà des actions sur les récepteurs post-synaptiques, et ce, en partie grâce aux profils spatiaux et temporels différentiels de chaque neurotransmetteur.

Au niveau pré-synaptique, la libération de deux neurotransmetteurs peut influencer le transfert d'information par plusieurs mécanismes qui ne sont pas mutuellement exclusifs, notamment : atténuer les signaux en modulant des autorécepteurs pré-synaptiques, transmettre des signaux spatialement ou temporellement distincts en séparant la libération de vésicules spécifiques (relargage spécifique, **Fig. 8 1 et 2**), ou véhiculer des informations similaires par la libération des deux neurotransmetteurs depuis la même vésicule synaptique (co-relargage, **Fig. 8 3**). De plus, un transporteur vésiculaire de neurotransmetteurs peut augmenter le conditionnement de l'autre neurotransmetteur dans la même vésicule synaptique, un processus appelé synergie vésiculaire (**Fig. 8 4**). En effet, en augmentant l'acidité de la vésicule par sa présence, le glutamate facilite l'entrée des neurotransmetteurs. Le remplissage des vésicules peut dépendre de deux paramètres : le gradient de pH, chimique (noté ΔpH) ou le potentiel transmembranaire, électrique (noté $\Delta\Psi$) (Edwards, 2007; Tabb et al., 1992). Au niveau des cibles post-synaptiques, la libération de deux neurotransmetteurs peut renforcer l'intensité d'un même signal et/ou transmettre des signaux uniques grâce à une expression de récepteurs spatialement restreinte et à des cascades de seconds messagers. Pour l'heure, il semblerait que les modes de libération dépendent des neurones et structures impliquées, et les mécanismes exacts sous-jacents restent encore à être compris. Bien que des études récentes aient fourni des éclairages sur ces phénomènes au niveau cellulaire, la pertinence comportementale de la co-transmission reste à explorer.

INTRODUCTION

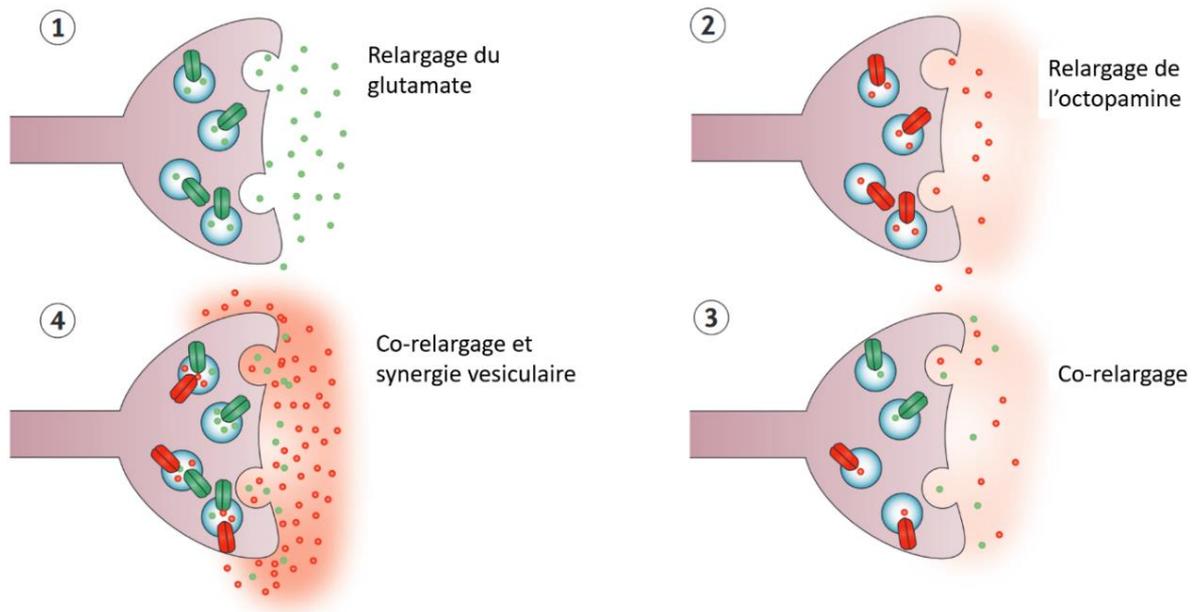


Figure 8 : Les 4 hypothèses de la double-transmission, adapté de El Mestikawy *et al.*, 2011

Un neurone ayant deux neurotransmetteurs tel que le glutamate et l'octopamine peut avoir 4 fonctionnements hypothétiques au niveau de sa terminaison axonale. 1) Il ne relargue que le glutamate. 2) Il ne relargue que l'octopamine. 3) Il co-relargue les deux neurotransmetteurs en synergie vésiculaire, *i.e.* la présence de l'un renforce la quantité de l'autre au sein des vésicules. 4) Il co-relargue les deux neurotransmetteurs à quantité égale.

Dans le second chapitre de cette thèse, nous étudierons en particulier un neurone présentant cette propriété de double transmission octopaminergique-glutamatergique : les neurones *Ventral Paired Medial 4* (VPM4). Nous nous y intéresserons à plusieurs titres. Tout d'abord, le VPM4 a été montré comme un acteur essentiel pour définir si la stratégie à adopter doit être agressive ou reproductive chez le mâle (Certel *et al.*, 2007). Et il permet d'étudier la pertinence comportementale de la double neurotransmission dans la régulation comportements agressifs (El Mestikawy *et al.*, 2011; Sherer *et al.*, 2020). Nous nous intéresserons également au MBON-11, l'un des neurones en aval des VPM4 formant le plus de synapse avec les VPM4. Un lien fonctionnel entre eux a été établi : l'activité des VPM4 inhibe celle des MBON-11 (Sayin *et al.*, 2019). Ce lien fonctionnel permet de réprimer les comportements de recherche de nourriture au profit de la prise de nourriture (Sayin *et al.*, 2019; Youn *et al.*, 2018). En effet, d'une part l'activité des VPM4 permet l'extension du proboscis et potentialise l'activité des neurones sensoriels du goût (Youn *et al.*, 2018). D'autre part, l'activité des MBON-11 permet de maintenir le comportement de poursuite d'odeur, un comportement impliqué dans la recherche de nourriture (Sayin *et al.*, 2019). Or, l'activation du VPM4 ou l'inhibition du MBON-11 amène la même inhibition de la poursuite de l'odeur, montrant bien que les VPM4 inhibent l'activité des MBON-11 (Sayin *et al.*, 2019). Si les deux sont actifs, c'est la réponse comportementale du VPM4 qui prévaut (Sayin *et al.*, 2019). Ces auteurs ont donc identifiés ces neurones comme

INTRODUCTION

régulant la recherche et la prise de nourriture qui dépendrait particulièrement de l'activité OA du VPM4 (Sayin et al., 2019; Youn et al., 2018). Toutefois, d'après les données de transcriptomiques disponibles à ce jour, les MBON-11 n'expriment pas de récepteurs à l'OA mais expriment des récepteurs glutamatergiques, ce qui suggère un rôle crucial de la transmission glutamatergique des VPM4 (Aso et al., 2019).

3.5.5. Les circuits neuronaux des comportements sociaux des mâles

L'agressivité et la cour dépendent de nombreux systèmes de neurotransmissions, de neurones et de structures à la fois communes et distinctes. Néanmoins, Lee et Wu proposent une synthèse des principaux circuits impliqués dans ces comportements (Lee & Wu, 2020) (**Fig 10**). Au cœur de ces circuits se trouve un groupe de trois neurones responsables de la bascule agressivité/cour : les pC1, les mAL et les LC1.

Tout d'abord, 1) les pC1 sont les neurones qui vont déterminer les comportements exprimés entre cour et agressivité. Ce choix peut dépendre de la population des pC1 activés : l'activité des neurones P1 (une sous population des pC1) qui expriment Fru^M vont permettre l'exécution de la cour, tandis que les pC1 qui exprime *dsx* vont exécuter l'agressivité (Koganezawa et al., 2016). Ce choix dépend aussi de l'intensité de l'activité des P1 : une activité basse fréquence (10-20Hz) promeut l'agression, tandis qu'une activité haute fréquence (30-50Hz) promeut la cour (Hoopfer et al., 2015). Une étude transcriptomique est en cours pour mettre au jour les récepteurs exprimé par P1 et les modifications d'expressions génétiques engendrées par l'expérience (contact social, cour...) (Ahmed et al., 2023). Néanmoins, les nombreuses entrées sensorielles qu'ils intègrent (*i.e.* gustatif, olfactif, auditif, et visuel) mobilisent d'ores et déjà différents systèmes de neurotransmission (*e.g.* GABA, DA, OA) et permettent le bon choix du comportement à émettre (Rings & Goodwin, 2019). 2) les mAL inhibent à la fois les populations des P1 impliqués dans l'agression et ceux impliqués dans la cour. 3) Les LC1 promeuvent l'agression en inhibant les mAL et les neurones pC1 impliqués dans la cour, levant ainsi l'inhibition des pC1 régulant l'agression, ce qui la promeut *in fine* (Koganezawa et al., 2016) (**Fig. 9**).

INTRODUCTION

Toutefois, deux nuances sont à apporter. Comme une étude a montré qu'une activation des mAL engendrait de l'agressivité, il est possible que les mAL soient divisés en deux sous-populations distinctes, dont une favorisant l'agression (Sengupta et al., 2022). Seconde nuance, notons que les neurones P1 pourraient avoir un rôle plus large car ils modulent également l'activité locomotrice induite par les interactions sociales (Zhao et al., 2024). Ces modulations seraient respectivement dues à la tachykinine, qui a aussi été impliqué dans l'augmentation de l'agressivité des drosophiles (Asahina et al., 2014), et à l'hormone diurétique 44 (DH44).

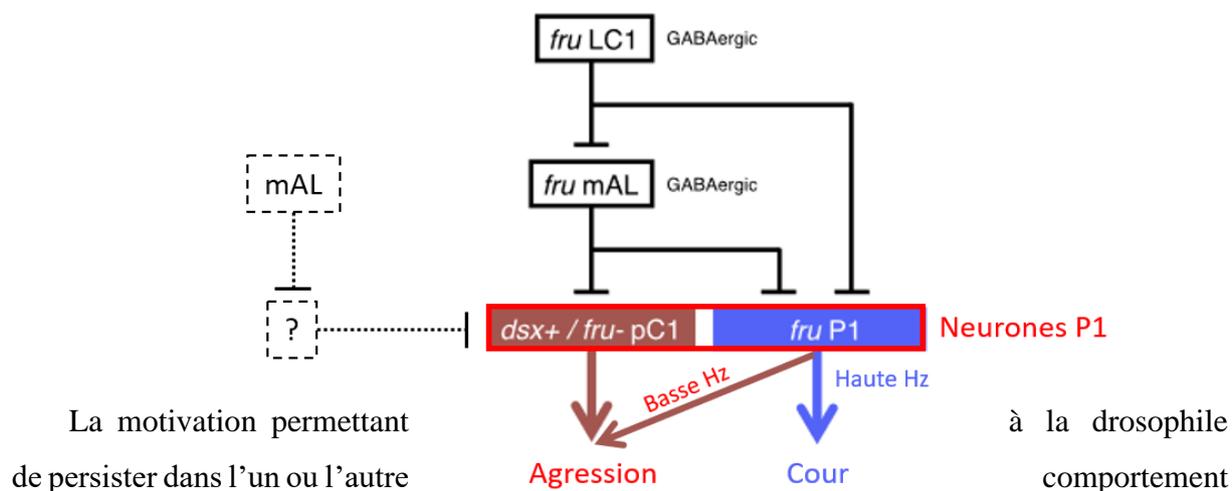


Figure 9 : Modèle du circuit LC1-mAL-P1 permettant la prise de décision, adapté de Koganezawa et al., 2016

Une population de neurone P1, les pC1 exprimant *dsx* (en marron) promeuvent l'agression. Les neurones P1 exprimant *fru* (en bleu) promeuvent la cour via une haute fréquence d'activité, ou l'agression via une basse fréquence. En amont, ces deux populations sont inhibées par les mAL, ce qui bloque l'expression des comportements. En amont des mAL, les LC1 inhibent les mAL et les *fru* P1, ce qui permet la levée de l'inhibition des *dsx* pC1 et ainsi l'expression de l'agressivité.

Une seconde population hypothétique des mAL (en pointillé) est susceptible de promouvoir l'agressivité en levant l'inhibition d'une population de neurones sur le comportement agressif.

serait sous-tendu par les neurones pCd, indirectement activé par les P1 (Jung et al., 2020; Zhang et al., 2019). Pour la reproduction en particulier, une boucle excitatrice s'auto-entretient entre les pCd et les neurones exprimant le neuropeptide F (NPF) pour maintenir la motivation (Zhang et al., 2019). Cette boucle pCd-neurones NPF va activer les neurones DA du SMP que nous avons mentionné plus tôt lorsque nous mentionnions le lien entre DA et reproduction. A leur tour, les neurones DA du SMP désensibilise les P1 à l'inhibition des mAL via le récepteur DR2 (Zhang et al., 2016, 2018), ce qui maintient l'expression des comportements de cour. Ces comportements de cour sont permis par un groupe de trois populations de neurones : 1) les P1, avec une activité excitatrice sur 2) des neurones de projections, ces-derniers excitant à leur tour 3) les centres générateurs de patterns, *i.e.* de comportements, responsable de la vibration de l'aile en elle-même.

INTRODUCTION

L'accouplement quant à lui est médié par deux populations de neurones exprimant *dsx* dans le ganglion abdominal postérieur : une population glutamatergique qui permet l'accouplement, et une population GABAergique qui y met fin, le tout médié par l'action de neurones mécano sensoriels (Pavlou et al., 2016). Des neurones DA et GABA vont quant à eux réguler la durée d'accouplement respectivement à la hausse ou à la baisse (Crickmore & Vosshall, 2013). Une fois la copulation accomplie, cette information sera transmise au système nerveux central via des neurones situés au niveau du ganglion abdominal postérieur. Cette information permet l'inhibition de la boucle de motivation pCd-neurones NPF et met fin au comportement de cour (Zhang et al., 2019).

L'agressivité est permise selon ce modèle par l'action combinée des P1, à basse fréquence, et des neurones OA sur les neurones aSP2 (Hoopfer et al., 2015; Watanabe et al., 2017). Néanmoins, notons que les neurones OA peuvent avoir un rôle plus large et permettent d'influencer la réponse comportementale (agressivité ou cour), de la même façon que les P1 (Certel et al., 2007).

INTRODUCTION

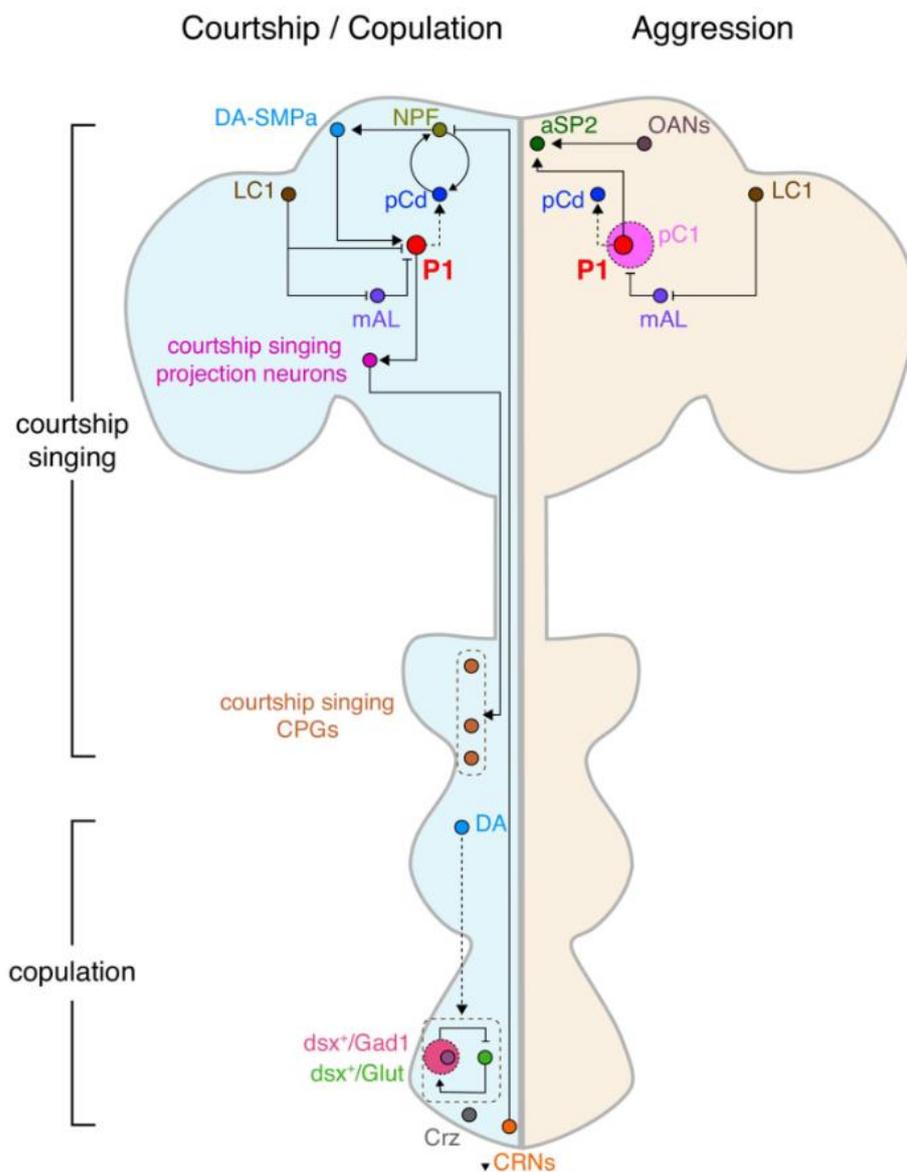


Figure 10 : Les circuits de la cour, de l'accouplement et de l'agression des mâles, tiré de Lee & Wu, 2020

Les neurones au cœur de cette régulation sont les neurones P1 (en rouge). La bascule agression/cour est faite par l'action des LC1 (marron) sur les neurones P1 et pC1 (cercle rose) directement ou indirectement par l'intermédiaire des neurones GABA mAL (violet). La fréquence de l'activité P1 définit le répertoire déclenché : une basse fréquence (10-20Hz) promeut l'agression tandis qu'une fréquence élevée (30-50Hz) promeut la cour.

La cour (*courtship*, partie bleue à gauche) est régulée par des neurones exprimant *fru* : les P1, les neurones de projections (rose) et des générateurs de patterns centraux (CPG, marron clair) dans la corde nerveuse ventrale pour exécuter le chant en soi. Les neurones DA du SMP (DA-SMPa, en bleu ciel) promeuvent l'accouplement en désensibilisant les P1 de l'inhibition des mAL. La boucle des neurones NPF (kaki) et pCd (bleu foncé) permettent de maintenir la motivation à courtiser en sollicitant l'activité des DA-SPMa. L'activité de la boucle est initiée indirectement par les P1, et n'est inhibée que par l'accouplement via les neurones reporteurs de copulation (CRN, orange).

L'accouplement est permis grâce aux neurones glutamatergiques exprimant *doublesex* (*dsx*) du ganglion abdominal postérieur, et inhibé par des neurones GABAergiques exprimant *dsx*. Une entrée de DA issue de la corde ventrale maintient l'activité copulatoire.

L'agressivité (partie jaune à droite) est déclenchée par l'activité des P1 et des neurones OA (en marron) sur les neurones aSP2 (vert). Les pCd permettent de maintenir la motivation au combat.

3.5.6. Les Corps Pédonculés

3.5.6.1. Les cellules de Kenyon et les neurones dopaminergiques

Les cellules de Kenyon (KC) sont les cellules neuronales composant les corps pédonculés (CP), d'abord décrites chez l'abeille (Kenyon, 1896). Chez la drosophile, ils représentent ~5 000 neurones (nombre total de neurones \approx 135 000) et sont divisés en 3 grandes classes de CK : $\alpha\beta$, $\alpha'\beta'$ et γ (Alivisatos et al., 2012; Fahrbach, 2006). A titre de comparaison, les CP des abeilles sont composés de 340 000 CK (nombre total de neurones \approx 1 million) (Fahrbach, 2006; Giurfa, 2003).

Les corps cellulaires et dendrites des CK sont regroupés pour former le calice, au niveau duquel les informations sensorielles issues des régions primaires vont leur parvenir. Celles-ci peuvent être de nature olfactive (Aso, Hattori, et al., 2014), gustatives (Masek & Keene, 2016) ou encore visuelles (Ganguly et al., 2023). Ainsi, les CP sont capables de percevoir des informations relatives aux phéromones et de moduler le comportement (Sakai & Kitamoto, 2006). Les projections axonales des CK forment des neuropiles pour *in fine* devenir les CP en eux-mêmes et ainsi former 5 différents lobes α , β , α' , β' et γ (**Fig 11**) (Aso, Hattori, et al., 2014). Nous ne détaillerons pas les différentes sous-populations de CK, en revanche notons qu'il existe différents compartiments au sein des CP basé sur la localisation de neurones de sorties des CP (*Mushroom Body Output Neurons*, MBON) qui les innervent (**Fig 12**). Ces neurones seront détaillés juste après.

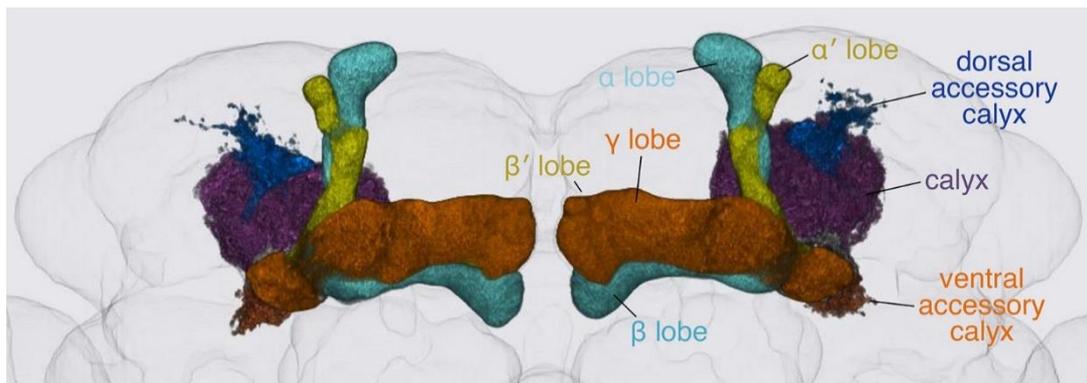


Figure 11 : Anatomie des corps pédonculés tiré de janelia.org, d'après le travail du Rubin lab

Les corps pédonculés sont constitués des dendrites des cellules de Kenyon. Elles se regroupent en 5 différents lobes : α , β , α' , β' et γ . Les corps cellulaires de ces neurones se trouvent au niveau du calice (calyx).

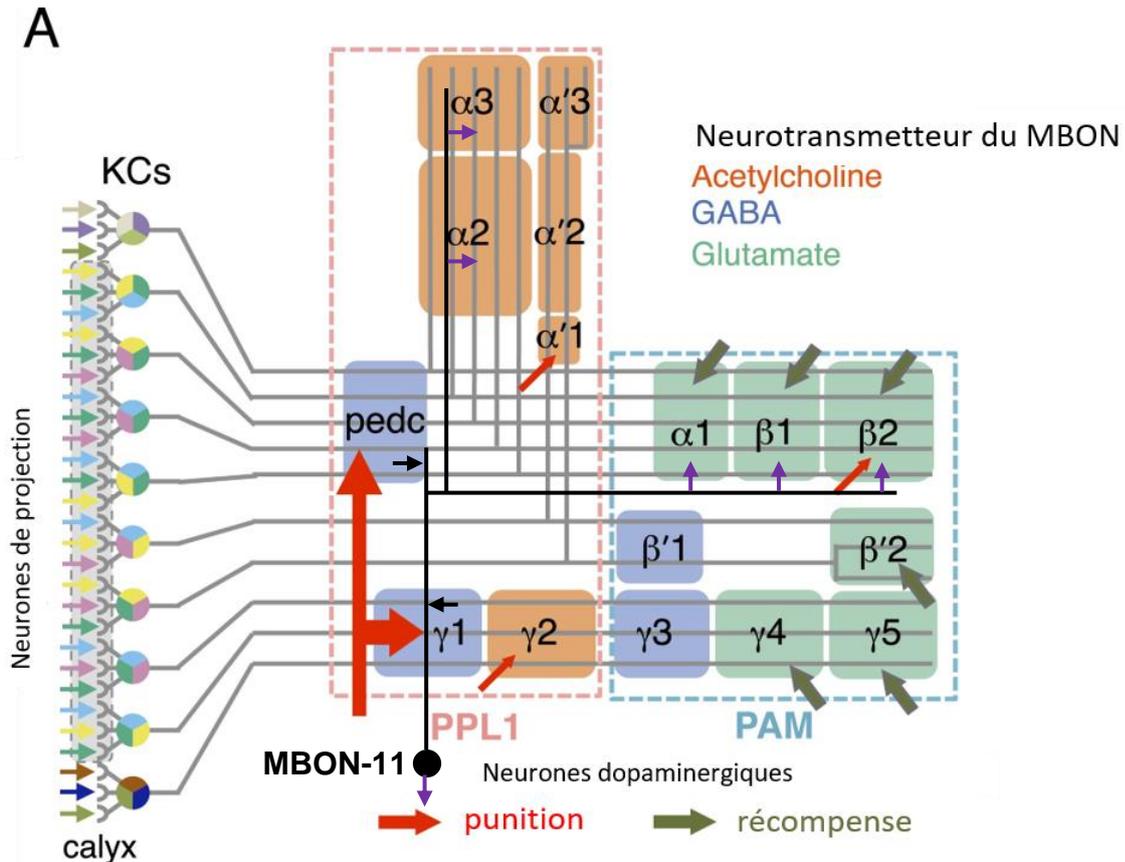


Figure 12 : Compartimentation des corps pédonculés et innervation des DAN, adapté de Aso *et al.*, 2014

Les neurones de projections envoient leurs axones sur les dendrites des cellules de Kenyon (KC). Les axones des KC forment les corps pédonculés (CP). Les CP sont divisés en différents compartiments en fonction du MBON associé au compartiment et de son neurotransmetteur. Les neurones PPL1 innervent principalement les compartiments du pédoncule (pedc) et $\gamma 1$ lesquels sont associés au MBON-11 (en noir, flèches noires), mais aussi $\alpha' 1$, $\gamma 2$ et $\beta 2$ pour associer une valeur de punition à un stimulus. Les PAM innervent les compartiments $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta' 2$, $\gamma 4$ et $\gamma 5$ pour y associer une récompense. Les MBON-11 renvoient des connexions à différents compartiments des CP (flèches violettes).

Fonctionnellement, les CK sont connus pour être impliqués dans diverses formes d'apprentissages et de mémoire : olfactifs et contextuels (Zars, 2000) ainsi qu'associatifs (Aso, Hattori, et al., 2014). Des études récentes ont montré que les différentes populations de KC sont impliquées dans différentes formes de mémoire. En effet, les CK γ sous-tendent essentiellement la récupération de la mémoire associative olfactive à court et moyen terme (entre ~15min et 3h), car leur blocage pendant la phase de récupération de cette mémoire l'altère (Güven-Ozkan & Davis, 2014). Les CK $\alpha\beta$ sont aussi nécessaires pour le court et moyen terme, mais leur blocage altère particulièrement la mémoire à long terme (>9h) (Güven-Ozkan & Davis, 2014). Enfin, les CK $\alpha'\beta'$ eux sont cruciaux pour la mémoire à court et moyen terme car contrairement

INTRODUCTION

aux neurones γ , pour lesquels le blocage se traduit par une altération de la mémoire, le blocage des CK $\alpha'\beta'$ supprime totalement la récupération à court et moyen terme (Güven-Ozkan & Davis, 2014). En plus de la mémoire, l'information issue des CK est nécessaire pour émettre des comportements agressifs adaptés (Baier et al., 2002; Edwards et al., 2009). En effet, des mutants n'exprimant pas le gène *rutabaga* codant pour l'adenylyl cyclase calcium-calmodulin dépendante, enzyme connue pour être impliqué dans la mémoire et la détection des coïncidences (Levin et al., 1992; Nöbel et al., 2023), montrent également des déficits de dominance à l'issue d'un combat (Chouhan et al., 2017; Trannoy et al., 2016). Les comportements agressifs et la dominance sont secourus en exprimant de nouveau *rutabaga* dans les différents lobes des CP (Chouhan et al., 2017). En conclusion, les différents CK sous-tendent la récupération de différents termes de mémoire, mais également la bonne adéquation des comportements agressif en permettant l'établissement de dominance.

L'apprentissage associatif est rendu possible par le fait que les CP encodent et associent des valences aux stimuli de l'environnements par détection de coïncidence (Aso, Sitaraman, et al., 2014). Cette détection ne se fait pas par les CK elles-mêmes, mais plutôt grâce aux neurones dopaminergiques (DAN) associés qui vont moduler les connexions synaptiques entre CK et MBON. Le mode de fonctionnement des DAN a été revu récemment, mais en quelques mots leurs rôles consiste à engendrer des dépressions au niveau des connexions CK/MBONs activées par l'odeur : si le stimulus est positif, les connexions CK/MBONs enclenchant l'évitement seront déprimés, et inversement si le stimulus est négatif, ce sera les connexions CK/MBON enclenchant l'approche qui seront déprimés et ce grâce aux récepteur dopaminergique dDA1 et DAMB situé en pré-synaptique, sur les CK (Davis, 2023). L'activité des récepteurs à la DA engendre une augmentation de l'AMPC dans les synapses, un second messager central dans les processus de plasticité synaptique (Sato et al., 2018; Tomchik & Davis, 2009). La simultanéité de l'activité des DAN et des CK est nécessaire pour que ce processus ait lieu, mais notons que la fenêtre temporelle dans laquelle cette simultanéité doit avoir lieu est modulée par la sérotonine (Zeng et al., 2023). Il y a deux grandes familles de DANs innervant les lobes des CPs : ceux dont l'activité vont permettre d'associer une punition (les PPL1), et ceux qui vont y associer une récompense (les PAM) (Aso, Sitaraman, et al., 2014). Ces DANs n'innervent pas les mêmes compartiments du CP, ce qui implique que punitions et récompenses ne sont pas relayés par les mêmes MBONs (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Ichinose et al., 2021; Modi et al., 2020; Perisse et al., 2016) (**Fig 9**). Ce système de renforcement positif ou négatif des stimuli est sûrement mobilisé au cours des combats. En effet, l'expérience de combat peut être vécu

INTRODUCTION

positivement ou négativement selon le résultat (*i.e.* positif pour une victoire et négatif pour une défaite) (Kim et al., 2018). Cette même étude implique particulièrement deux neurones sous-tendant ces processus : les PPL1-01 et les MBON-11. Par conséquent, ce système de renforcement des stimuli est probablement mobilisé au cours des combats pour permettre aux individus d'adapter leurs comportements.

3.5.6.2. Les neurones de sorties des corps pédonculés (MBON) et le MBON-11

Les MBON ont pour rôles de sortir l'information qui a été traité par les CP vers d'autres régions du cerveau : la crépine, le protocerebrum supérieur médian (SMP, que nous avons vu impliqué dans la reproduction dans la partie sur la dopamine), supérieur intermédiaire (SIP), supérieur latéral (SLP, régions en relation avec les neurones GABA mAL impliqué dans l'agressivité) et la corne latérale (en lien avec le GSO et qui traite des informations relatives aux odeurs et à la satiété). Chez la drosophile, il existe 21 types de MBONs, auxquels on peut rajouter 14 dits « atypiques » qui reçoivent des informations en dehors des CP (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Rubin & Aso, 2024). Nous nous consacrerons ici aux « classiques ». Parmi les MBONs classiques, la majorité sont cholinergiques, quelques-uns glutamatergiques et trois sont GABAergiques. De plus, trois MBONs (les MBONs glutamatergiques-5 et -6 et le MBON GABAergique-11) ont la particularité de pouvoir renvoyer des axones aux CP, créant une boucle de rétroaction (Aso, Sitaraman, et al., 2014). Fonctionnellement, la plupart des MBONs permettent 1) la formation de mémoire par des mécanismes de plasticité synaptique comme nous l'avons vu précédemment lorsque nous discutons des CK (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Ichinose et al., 2021; Modi et al., 2020; Perisse et al., 2016) et 2) l'exécution des comportements sociaux tels que l'agressivité dans la mesure où bloquer l'activité des CK, les neurones dont les MBON relayent l'information, les altèrent (Baier et al., 2002).

Au cours de notre étude, nous nous intéresserons particulièrement aux MBON-11 (ou MBON- γ 1pedc $>\alpha/\beta$, anciennement connu comme MB-MVP2). Les données de connectomiques montrent que les MBON-11 forment une boucle de rétroaction sur son homologue controlatéral, lui donnant la capacité de s'auto-réguler (Buhmann et al., 2019; Dorkenwald et al., 2023; Heinrich et al., 2018; Schlegel et al., 2023). D'un point de vue fonctionnel, il a été montré qu'inhiber les MBON-11 lors d'un test d'apprentissage associatif olfactif entre une odeur et la possibilité de courtiser une femelle altérait la mémoire à long terme mais pas à court terme (Shen et al., 2023). Les MBON-11 ont été impliqué dans l'attribution de

INTRODUCTION

valence des stimuli. En effet, lorsqu'il y a détection de coïncidence entre un stimulus détecté par les CK et une punition détectée par les PPL1-01, les connexions synaptiques KC/MBON-11 sont déprimés par les PPL1-01 pour inhiber la réponse du MBON-11 à ce stimulus et permettre son évitement (Hancock et al., 2022; Pavlowsky et al., 2018). Or, inhiber directement les MBON-11, mimant en quelques sortes l'effet des PPL1-01, en même temps que de présenter un stimulus induit un comportement d'évitement, ce qui montre bien que le MBON-11 attribue des valences aux stimuli (König et al., 2019). L'attribution de valence par les MBON-11 est également valable pour les stimuli sociaux, comme une défaite ou une victoire à l'issue d'un combat. En appariant une odeur à un combat à plusieurs reprises, puis en testant la préférence à cette odeur 24h après, les gagnants approchent l'odeur (*i.e.* ont associé une valence positive à au combat et à la victoire) tandis qu'au contraire les perdants l'évitent. Or en bloquant soit les PPL1-01, soit les MBON-11, pendant le combat (*i.e.* pendant l'apprentissage de l'association), les perdants ne montrent plus aucun évitement ni approche vis-à-vis de l'odeur (Kim et al., 2018). Inversement, l'activité conditionnelle par UAS-dTrpA1 des MBON-11 réduit l'évitement spontanée à certaines odeurs aversive et facilite la mémoire appétitive y compris chez des drosophiles nourries pour qui l'association odeur-sucre ne devrait pas particulièrement être facilitée (Perisse et al., 2016).

Pour former ces différentes formes de mémoires, l'interaction PPL1-01/MBON-11 est centrale. Le signal DA des PPL1-01 est transmis via les récepteurs dopaminergiques DAMB et dD2R à la surface du MBON-11 et permettent de former cette mémoire (Pavlowsky et al., 2018; Plaçais et al., 2017). D'après les auteurs, le processus de mémoire à long terme se passe en deux temps. 1) D'abord une inhibition du MBON-11 par les PPL1 via les dD2R, puis 2) une activation des MBON-11 par les PPL1-01 via les DAMB, cette activation ayant pour effet la rétro-inhibition des PPL1-01 via le récepteur GABA_B-R1 (Pavlowsky et al., 2018). Ce circuit permettrait alors selon les auteurs le bon fonctionnement de la mémoire à long terme et dépend de la bonne temporalité de l'activation de chacun de ces neurones. Ainsi, le couple PPL1-01 et MBON-11 permet la rétention des stimuli aversifs grâce à la plasticité synaptique induite par la DA (Davis, 2023). Néanmoins, le bon fonctionnement du PPL1-01 peut être perturbé par un excès d'activité DA induite par un stress chronique, amenant un déficit de mémoire où le récepteur Dop1R1 et la sous-activité du MBON-11 serait en cause (Jia et al., 2021).

L'activité du MBON-11 est modulée par l'état interne de la drosophile. A jeûne, son activité est augmentée et facilite la formation de mémoire appétitive, bien que l'activité du MBON-11 permette également la formation de mémoire aversive (Kim et al., 2018; Perisse et

INTRODUCTION

al., 2016; Sayin et al., 2019). Pour certains auteurs, le MBON-11 étant un MBON incitant à l'approche, le fait d'avoir une activité neuronale réduite serait prédictive d'une punition à venir (König et al., 2019). Ensemble, ces résultats suggèrent qu'une activité normale du MBON-11 promeut l'approche, qu'une activité réduite présage d'une punition, mais qu'un signal absent ou anormalement long altère les fonctions mnésiques de la drosophile.

3.5.6.3. Les APL & DPM

En plus des DANs, d'autres entrées majeures modulent l'activité des CP. Parmi eux, les neurones GABAergiques APL sont capables d'inhiber les CP au niveau de différents compartiments indépendamment (Amin et al., 2020). Les APL innervent largement les CK et de façon intéressante, sont l'une des principales sorties du MBON-11 d'après les données actuelles en connectomiques. Leur activité synaptique semble permettre le bon apprentissage et discrimination olfactives des larves drosophiles (Saumweber et al., 2018), ainsi que la mémoire associative et la valeur des récompenses (Mancini et al., 2023; Zhou et al., 2019). Par conséquent, il est possible que la communication entre APL et MBON-11 constitue une boucle nécessaire à la bonne régulation des MBON-11 et donc du comportement agressif.

Une seconde population de neurones envoie de nombreux input sur les MBON-11 : les neurones *dorsal paired medial* (DPM). Ces neurones sont sérotoninergiques et GABAergiques. On suppose que les DPMs interviennent particulièrement dans la consolidation, car inhiber leur transmission n'a d'impact sur la mémoire que lorsqu'elle est faite juste après l'apprentissage (Güven-Ozkan & Davis, 2014; Keene et al., 2006; Lee et al., 2021). Ces neurones sont aussi impliqués dans l'apprentissage olfactif des drosophiles (Yu et al., 2005), mais réagissent différemment tant dans la force que dans la forme d'activation face aux valences des stimuli. Les stimuli aversifs induisent une réponse synaptique plus forte que celle induite par des stimuli appétitifs, mais les stimuli appétitifs engendrent une réponse plus longue. De plus, la réponse aversive se concentre en une branche du neurone contre plusieurs branchements pour le stimulus appétitif (Cervantes-Sandoval & Davis, 2012). Compte tenu de ces rôles, l'étude des DPM pourrait nous permettre de mettre en lumière une autre entrée des MBON-11 capable de moduler son activité et donc l'agressivité, la valence des stimuli ou leur mémoire.

Problématique de la thèse

Au cours de cette introduction, nous avons pu mettre en évidence le manque de compréhension qui existe autour de la dérégulation des comportements agressifs et de ses conséquences pour les individus. Dans cette thèse, nous tâcherons de répondre à la problématique générale qui interroge la régulation du comportement agressif et de ses conséquences pour l'adaptabilité des espèces. Quelles sont les facteurs qui modulent l'agressivité, de quelle façon celle-ci se module en réponse et quels mécanismes biologiques permettent une telle adaptation ? Pour y répondre, nous emploierons le modèle animal de la drosophile. Le premier axe tournera autour des conséquences des interactions agressives sur les comportements de parade nuptiale et de reproduction, une adaptabilité que l'on pourrait qualifier de sociale. Dans un second temps nous étudierions quels mécanismes et circuits neuronaux peuvent être responsable de la dérégulation de l'agressivité. Nous discuterons ensuite de ces résultats avant d'en tirer les conclusions qui conviennent et d'ouvrir sur la suite du projet.

Objectif 1 : L'adaptabilité sociale – conséquences de l'agressivité sur la reproduction

Dans le premier chapitre de cette thèse, nous nous sommes questionnés sur comment les comportements agressifs impactent les capacités de reproduction des mâles. Dans la littérature, un faisceau d'indices semble montrer que les perdants ayant un statut de dominé ont des chances de reproduction réduites, mais les études sur les causes faisant le lien entre agressivité et réduction d'accouplement sont moins étudiées. Nous avons voulu étudier dans quelle mesure les issus des combats entre deux mâles influencent : 1) leur territorialité, 2) leurs comportements reproducteurs, 3) les préférences des femelles, et 4) en combien de temps.

Objectif 2 : Mécanismes neuronaux de régulation du comportement agressif

Dans le second chapitre, nous avons remonté la chaîne causale en nous attardant sur les mécanismes fondamentaux dérégulant les comportements agressifs. Les drosophiles sont capables d'exprimer différentes intensités de comportements agressifs, et bien souvent ceux-ci se cantonnent à des menaces et des *lunges* de la part d'un individu sur l'autre. Mais il est parfois possible d'observer une escalade de l'agressivité sous forme de phénomènes de boxe, auquel cas la dominance n'est pas aussi nette. En exprimant différents ARNi et en modulant l'activité des neurones VPM4 et MBON-11, nous avons voulu comprendre quelles activités neuronales étaient responsables de l'escalade de l'agressivité chez la drosophile et quels mécanismes moléculaires sous-tendent de telles capacités.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Elevage & lignées des drosophiles

Tests comportementaux

3.6. Elevage des drosophiles

Au cours de cette thèse, les drosophiles parents ont été élevés à 25°C en incubateur sous un cycle jour:nuit de 12:12 heures. Les incubateurs étaient éclairés par des bandes de lumières LEDs blanches. Un taux relatif d'humidité de 50% était maintenu. Les drosophiles élevées à 25°C étaient repiquées tous les 2 jours. Les drosophiles utilisées pour les croisements étaient élevées quant à elles à 18°C dans des incubateurs dans les mêmes conditions d'éclairage et d'humidité, et étaient repiquées tous les 3 jours. Pour effectuer les croisements, les femelles vierges des lignées GAL4 ont été isolées au stade pupal (la présence de mâle isolé par erreur dans ces bouteilles était systématiquement vérifiée). Les mâles des lignées UAS ont directement été prélevés après éclosion des pupes, à l'âge adulte.

Toutes les drosophiles étaient élevées dans des bouteilles d'élevage en plastique de 90mL, contenant du milieu d'élevage standard. Pour 1L de milieu, celui-ci était composé de 1L d'eau, 7.5g d'agar, 40g de sucre, 28g de levure, 74g de farine, 10ml de Moldex® (un antifongique) et 4mL d'acide propionique liquide.

Les mâles drosophiles de génération F1 issus des croisements utilisés pour les tests comportementaux ont été isolés au stade de pupa noire. A l'aide d'un pinceau imbibé d'eau, chaque pupa était récoltée de la bouteille d'élevage et placée dans un tube d'isolement de 5mL, contenant approximativement 1mL de milieu standard et fermé par un morceau de coton.

Lorsque le génotype des drosophiles F1 contenait dTrpA1 ou shibire^{ts}, les croisements étaient maintenus à 18°C, et lorsqu'il contenait GAL80^{ts} ou une séquence ARNi, ils étaient maintenus à 18°C puis placés à 25°C 72h avant le test.

3.7. Lignées utilisées

Nous avons utilisé au cours de cette thèse le système UAS/GAL4 précédemment décrit. L'ensemble des lignées contrôles (en gris), GAL4 (en vert), et UAS (en orange) utilisées au cours des travaux de cette thèse ainsi que leur référence sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 5**) :

Tableau 5 : Lignées utilisées dans les différents chapitres

Lignée	Référence	Fournisseur	Description
Canton Special (Cs)	/	Kravitz Lab	Lignée contrôle de référence
Lignée GAL4	Référence	Fournisseur	Cible
MB112C-GAL4	68263	Bloomington	Les MBON-11
MB113C-GAL4	68264	Bloomington	Les VPM4
MB298B-GAL4		Aso et al. 2014	Les MBON-5
Lignée UAS	Référence	Fournisseur	Effet
UAS-RNAi GABA _B -R1	51817	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur GABA _B -R1
UAS-RNAi GABA _B -R2	50608	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur GABA _B -R2
UAS-RNAi GABA _B -R3	50622	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur GABA _B -R3
UAS-RNAi Rdl	52903	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur Rdl
UAS-dTRPA1	26264	Bloomington	Exprime le canal dTRPA1
UAS-Shi ^{ts}	/	Kravitz Lab	Exprime le gène shibire ^{ts}
UAS-RNAi VGAT	V103586	VDRC	Inhibe l'expression du transporteur vésiculaire du GABA, VGAT
UAS-VGLUT	81119	Bloomington	Surexprime le transporteur vésiculaire du Glutamate, VGLUT
UAS-RNAi NMDAR1	25941	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur NMDAR1
UAS-RNAi NMDAR2	40846	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur NMDAR2
UAS-RNAi GluCl α	53356	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur GluCl α
UAS-RNAi mGluR	34872	Bloomington	Inhibe l'expression du récepteur mGluR
UAS-GAD1	93606	Bloomington	Surexprime l'enzyme de synthèse du GABA, GAD1
UAS-RNAi GAD1	51794	Bloomington	Inhibe l'expression de l'enzyme GAD1
UAS-RNAi GLS	62216	Bloomington	Inhibe l'expression de l'enzyme GLS
UAS-RNAi GS2	40949	Bloomington	Inhibe l'expression de l'enzyme GS2
UAS-RNAi GOT2	106120	VDRC	Inhibe l'expression de l'enzyme GOT2
UAS-RNAi GABA-T	54993	Bloomington	Inhibe l'expression de l'enzyme GABA-T

3.8. Tests comportementaux d'agressivité

Les mâles testés étaient âgés de 7 jours. Les comportements agressifs ont été évalués en accord avec les protocoles développés par la littérature (Chen et al., 2002; Kravitz & Fernandez, 2015; Trannoy et al., 2015). Chaque dyade de drosophiles était testée dans une arène du dispositif (**Fig 13**). Un dispositif consistait en un bloc (10cm de long x 3.2cm de large x 1.8cm de haut) de 3 arènes circulaires indépendantes (chacune de 2.2cm de diamètre et 1.2cm de haut) avec en leur centre un territoire circulaire (1.2cm de diamètre et 0.6cm de haut). Celui-ci était rempli de milieu d'élevage avec une goutte de levure réhydratée au centre préparée juste avant les tests. Des séparateurs étaient ensuite insérés par le haut des arènes pour diviser celle-ci en deux parties égales, puis les drosophiles étaient introduites de chaque côté de l'arène par géotaxie négative. Les arènes étaient ensuite fermées avec des bouchons en mousse avant d'être déposées sous les caméras. Après une période d'acclimatation de 10 min (sauf pour *Shibire*^{ts} qui était de 30 min), l'enregistrement vidéo d'environ 30 min pouvait commencer grâce à des caméras Pylon Basler 5.x pilotées par le logiciel multicaméras StreamPix8 et les séparateurs étaient retirés.

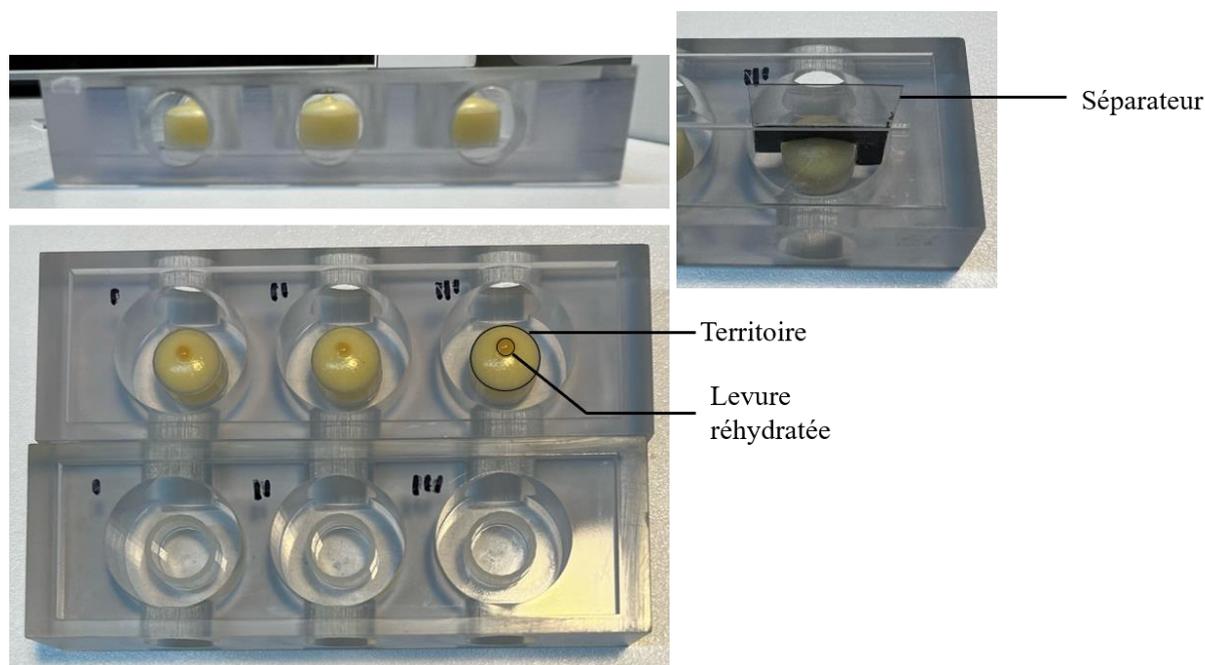


Figure 13 : Dispositifs expérimentaux pour tester l'agressivité

Chaque dispositif contient 3 arènes circulaires de 2,2cm de diamètre pour 1,2cm de haut. Au centre, un territoire de 1,2cm de diamètre et de 0,6cm de haut était rempli de milieu standard de façon à être légèrement bombé. Au milieu de la nourriture était placée une goutte de levure réhydratée. Les arènes étaient séparées par un séparateur pour assurer un temps d'acclimatation sans interaction avec l'autre mâle. Les entrées de l'arène étaient bouchées à l'aide de bouchons en mousse.

Lorsque le test nécessitait une température plus élevée (avec l'utilisation de *dTrpA1* et *Shibire*), les dispositifs étaient placés dans une boîte chauffée par un tapis HPTERRA (117cm

x 275 cm) (**Fig 14**). Si au contraire, il nécessitait une température plus basse, le thermostat de la salle dans sa globalité était diminué.

Une fois les enregistrements terminés, les analyses comportementales étaient menés semi-automatiquement sur BORIS 8.24.1 (Friard & Gamba, 2016). Les comportements de *lunes*, de boxe ont été scoré et la latence d'attaque calculé sur BORIS pendant les 5 minutes suivants la première attaque. Un temps *cut-off* a été fixé à 15 minutes après la première rencontre entre les deux individus si aucune attaque n'a été observée pendant cette période.

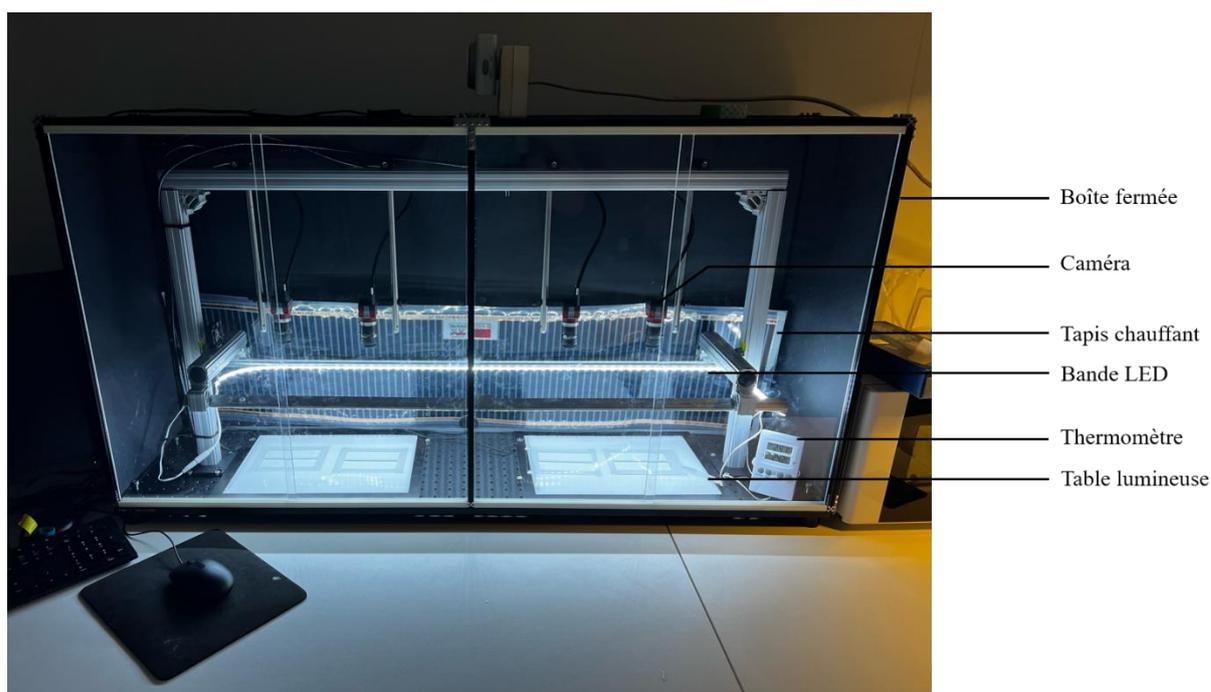


Figure 14 : Chambre d'enregistrement des arènes à haute température

La chambre consistait en une enceinte fermée par des plaques en plexiglas. Les arènes étaient filmées du dessus par des caméras, et l'enceinte était chauffée par un tapis chauffant. La température était contrôlée par un thermomètre digital. Une bande LED blanche éclairait les arènes du dessus, tandis que des tables lumineuses les éclairait du dessous. L'enregistrement des arènes à température ambiante et basse température se faisait sur un second dispositif qui ne disposait pas de boîte fermée.

3.9. Evaluation du comportement reproducteur

Les comportements reproducteurs de la drosophile ont été évalués dans des dispositifs similaires à ceux de la **figure 13** à ceci près que ces dispositifs possèdent un sol plat, sans territoire. Pendant ces tests, le calcul d'un index de vigueur de cour (CVI) est fait sur la base du temps où le mâle montre un comportement de cour par rapport au temps total d'observation. L'ensemble de la méthodologie relative à ces tests sera détaillé dans le chapitre 1.

RÉSULTATS

Chapitre 1

Les perdants montrent moins de motivation à courtiser 1h seulement après la défaite

En compétition, les perdants montrent une diminution de leur performance de cour

Les mâles distinguent parfaitement mâle et femelle après le combat

Les femelles ne montrent pas de préférence envers les gagnants ou les perdants

Chapitre 2

L'activation par dTrpA1 des VPM4 dérégule l'agressivité

Seul l'augmentation du relargage de GLU dans les VPM4 dérégule l'agressivité

L'activation par dTrpA1 des MBON-11 dérégule l'agressivité

Le récepteur inhibiteur GLU GluCl α sur le MBON-11 lie le GLU relargué par le VPM4

Les récepteurs inhibiteurs GABA Rdl et GABA_B-R3 sont nécessaires pour réguler l'activité du MBON-11 et prévenir les phénomènes de boxe

La transmission de GABA du MBON-11 est impliquée dans la régulation de l'agressivité

1. Conséquences d’un combat sur la reproduction

1.1. Introduction

Inaugurons la partie résultat de cette thèse en abordant l’effet des interactions agressives sur ce que j’appelle ici l’adaptabilité sociale. Il est possible d’envisager ce terme comme une composante de la *fitness*, c’est-à-dire de la capacité d’un individu à se reproduire et à perpétuer ses gènes. Néanmoins, comme nous nous sommes arrêtés ici au succès copulatoire et à la préférence mâle/femelle, je préfère parler d’adaptabilité sociale. Autrement dit, nous avons étudié dans quelle mesure le résultat d’un combat impacte les capacités reproductives futures des individus, et quels peuvent en être les mécanismes. Cette recherche a fait l’objet d’une publication dans PlosONE dont l’article est reporté dans la section suivante. Pour resituer le contexte de cette étude, nous avons vu qu’agressivité et reproduction sont liés dans l’introduction générale : au niveau du comportement, du cerveau et de la physiologie. La compétition par usage d’agressivité est un moyen pour accéder à des partenaires de reproduction. Plusieurs études en ce sens ont déjà investigué la question par le biais des effets gagnant/perdant mentionnés plus tôt. Ainsi, en règle générale, les gagnants sont plus performants et accèdent plus aux femelles que les perdants (Filice & Dukas, 2019; Hsu et al., 2005; Teseo et al., 2016), néanmoins des études montrent que les perdants peuvent adopter des stratégies compensatoires notamment post-copulatoires (Filice & Dukas, 2019). Par exemple, les mâles perdants montrent un temps de copulation augmenté, un meilleur succès de paternité et améliorent la fécondité de la femelle qui engendrait plus de descendance qu’avec un gagnant. Peu de données quant à la temporalité de ces phénomènes sont disponibles. Nous nous sommes alors demandé si ces conséquences sont induites et observables de suite après une victoire ou une défaite et si un délai était nécessaire. De plus, nous avons testé si l’issue d’un combat et son influence pouvait reposer sur des mécanismes de préférences différenciés entre les perdants et les gagnants que ce soit de la part des mâles envers d’autres mâles ou une femelle, ou des femelles envers un mâle gagnant ou perdant. Cela semble être le cas chez d’autres espèces, néanmoins la préférence spontanée des femelles pour des individus mâles peut varier, allant soit vers le perdant soit le gagnant (Chan et al., 2008; Loranger & Bertram, 2016). Ainsi, nous avons étudié cette préférence chez la drosophile afin d’étudier dans un autre projet les conséquences de l’hyperagressivité sur la reproduction (Defert *et al.*, non publié), ce domaine étant largement sous-étudié comme nous l’avons vu en introduction.

1.2. Article PLOS ONE : Prunier & Trannoy, 2024

PLOS ONE

Learning from fights: Males' social dominance status impact reproductive success in *Drosophila melanogaster*

Antoine Prunier, Severine Trannoy^{1B} *

Research Center on Animal Cognition (CRCA), Center for Integrative Biology, Toulouse University, CNRS, UPS, Toulouse, France

* severine.trannoy@univ-tlse3.fr

Citation: Prunier A, Trannoy S (2024) Learning from fights: Males' social dominance status impact reproductive success in *Drosophila melanogaster*.

PLoS ONE 19(3): e0299839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839>

Editor: Gregg Roman, University of Mississippi, UNITED STATES

Received: November 21, 2023

Accepted: February 16, 2024

Published: March 7, 2024

PeerReviewHistory: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839>

Copyright:© 2024 Prunier, Trannoy. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

DataAvailabilityStatement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by the French Research National Agency (ANR) (ANR-19-CE37RESEARCH ARTICLE 0018-01), and the Fondation Fyssen (190573) to S. T. Funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish or preparation of the manuscript. <https://anr.fr/> <https://www.fondationfyssen.fr/en/>.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

In animals, the access to vital resources often relies on individuals' behavioural personality, strength, motivation, past experiences and dominance status. Dominant individuals would be more territorial, providing them with a better access to food resources and mate. The so-called winner and loser effects induce individuals' behavioural changes after experiencing a victory or a defeat, and lead to an individual persistent state influencing the outcome of subsequent fights. However, whether and how development of winner and loser effects affect individuals' fitness is controversial. The aim of this study is to evaluate how individuals' fitness can be influenced by previous fighting experience in *Drosophila melanogaster*. In this study, we assess various behavioural performances as indicators for dominant and subordinate fitness. Our results show that subordinates are less territorial than dominants although their locomotor abilities are not affected. We also demonstrate that in a non-competitive context, experiencing a defeat reduces males' motivation to court females but not the reproductive success while in a competitive context, it negatively affects males' reproductive success. However, we found no impact upon either males' ability to distinguish potential mates nor on females' choice of a specific mating partner. Overall, these results indicate that previous defeats reduce reproductive success, a commonly used estimate of individual fitness.

Introduction

One of the fundamental characteristics of animals is their ability to react appropriately in a constantly changing and challenging environment, which ultimately benefits their fitness *i.e.* the probability of an individual to survive and its capacity to pass its genetic material to its offspring [1]. Behavioural adaptation relies on crucial processes such as integration of environmental sensory cues and animals' past experiences. Indeed, animals can perceive relevant information such as the presence of conspecifics or food resources and generate appropriate behavioural responses, while their past experiences are used to provide adaptive responses to changing environmental conditions and provide behavioural flexibility.

Animals often adjust their behavioural responses to information provided by social interactions. Among the latter, aggressive behaviours are widespread across the animal kingdom. They are essential to the establishment of group structure, and to access to primary resources (*e.g.* food, territory, sexual partners...) or protection [2]. For this reason, aggression has a high adaptive value and is often observed in the context of inter-specific competition. On one hand, animals need to assess the benefits/risks balance when engaging into aggressive interactions: is there something to fight for and is it something valuable? Against whom? Is it risky? [3]. On the other hand, animals adapt the pattern and intensity of their aggressive

behaviours as well as their fighting strategy depending on the outcomes of previous fights. Such behavioural adaptation is highlighted by the formation of winner and loser effects, consisting in the increasing probability to win subsequent fights after victories, or to lose after defeats, respectively [4].

In this study, we used the fruit fly *Drosophila melanogaster* as an animal model capable of various social behaviours: aggregation [5], courtship [6] and intra-sex aggression [7]. In fruit flies, cuticular hydrocarbons (CHC), such as some pheromones—*e.g.*: (Z)-7-tricosene (7T) or 11-cis-vaccenyl acetate (cVA)—play major roles in individuals’ identification, and drive behavioural responses towards courtship or aggression [3, 8–10]. When competing for food or mates, male flies start interacting with each other until one decides to display some physical attacks, called lunges. In general, after multiple lunges from the same male, the second one retreats from the food resource. Wing threats can also be observed as offensive or defensive behaviours. In rare cases, high-intensity aggressive pattern can be observed, such as tussling or boxing [7]. The repetition of this behavioural sequence—lunges/retreats—allows the formation of dominance relationship between competitors, that will generate winner and loser states, involving learning and memory processes [11, 12].

Winner and loser effects are found in a wide range of species including humans [13], mammals [14], fish [15], birds [16], crustaceans [17], arthropods [18] and in fruit flies [11], and may durably impact animals’ behaviour. Contests may influence behaviour in various ways according to the sex and the species. In males, these effects can be explained by an increased motivation to fight after previous victories while it is reduced following defeats, with a central role given to sexual steroids such as androgens and monoamines [19, 20]. For instance, androgens level is increased in cichlid fish when fighting, even towards its own reflection, and increases the likelihood of winning subsequent encounters [15], while in rodents, winning fights induces testosterone pulses [20]. Another study found an increased tyrosine hydroxylase expression level in winners’ brain regions controlling social and motivational behaviours [19]. In *D. melanogaster*, single victory and defeat respectively increases and decreases the likelihood to win and lose subsequent fight for few minutes to hours [11]. Recently, it has been shown that serotonin is involved in the short-term loser effect [21]. However, repeated defeats induce long-lasting loser effects for at least a day and is dependent on *de novo* protein synthesis [11, 22]. A remarkable case was observed in the mangrove killifish, where a previous defeat continues to exert its influence on the outcome of further fights, even a month later. These show

that previous fighting experiences may profoundly affect individuals, from their behaviour to their genes and physiology, in both short- and long-term ways.

While previous victory confers fighting advantages to winning individuals, the extent to which it may also confer mating advantages and may potentially increase males' overall fitness remains a subject of controversy. In the mosquitofish for instance, victories increase reproductive success [23]. In males jumping spider *Thiania bhamoensis*, quivering courtship behaviour is enhanced after winning, which increases reproductive success, even though the females tend to prefer loser males when she did not watch the fight [24]. In crickets *Gryllus assimilis* however, females have a preference for dominant males, whether they saw the fight or not [25].

Studies on *D. melanogaster* and *prolongata* have revealed that subordinated status is associated with longer latency to court and less successful reproductive behaviour while dominant status do not improve reproductive success compared to naïve flies [22, 26–29]. However, the reproductive males' advantages seemingly provided by the winner effect is not observed in all species. In the earwig *Euborellia brunneri*, only loser effect has been observed in males, and females do not show preference towards winner, loser or naïve males [30]. In the olive fruit fly *Bactrocera oleae*, both winners and losers showed higher aggressive behaviours against naïve flies. [31]. In the fruit fly, it has been found that winners get more access to the female but the losers showed higher post-copulatory investment [29]. Hence, winner and loser effects influence the outcome of further social interactions either with potential same-sex competitors or mates, and represent *in fine* one of the mechanisms contributing to natural selection. Nonetheless, the consequences and mechanisms of how previous fighting experience may impact reproductive success still remain to be clarified.

The aim of the present study was to explore whether and how previous fighting experiences influence some behavioural aspects essential for males' reproductive success. We first assessed the territoriality of males and present evidence that subordinate males are less territorial than dominants, despite that their locomotor abilities are not affected, leading to a potential disadvantage to access food resources or potential mates. Then, we examined the motivation to court females, and show that previous defeat alters this motivation to court females without affecting the reproductive success of subordinates. However, in a competitive context, subordinates presented a reduced reproductive success over dominant males. Finally, we demonstrate that males' perception is not modified by past fighting experiences, and that

females did not present preferences for males with dominant social status. Overall, this study demonstrates the impact of males' social dominance status on their future behaviours and further social interactions with conspecifics, ultimately leading to potential impact on their fitness.

Materials and methods

Flies

The *Drosophila melanogaster* from the strain *Canton-Special* (CS) was used for this study. Flies were raised on standard food medium at 25°C and 50% relative humidity in incubators under a 12:12 hours light:dark cycle with white LED strips.

For behavioural tests, males and females were reared in social isolation from late pupal stage to the day of testing to ensure reliable aggression [32]. They were kept in 5ml vials closed by a piece of cotton and containing about 1ml of standard fly food. Behavioural assays were performed at 7-days old, between 9:00 and 12:00 which is the first 3 hours of the daily light cycle.

Experimental chamber

The experimental setup used in this study to examine social behaviours has already been described [33]. Briefly, tests were performed in a circular arena (22mm diameter x 16mm height) with a food cup in the middle. An opaque plastic divider was inserted from the top of the lid, separating the arena in two equal sides. Flies were then inserted on each side of the arenas by negative geotaxis, and had 10min to acclimatise, without interacting with each other. Behavioural experiments started once the separator was removed, allowing flies to interact together. Each experiment was performed at 25°C.

Behavioural assays

Aggression assays and establishment of winner or loser state. The experimental protocol was previously described in Trannoy, et al. [33]. Flies were anesthetized with CO₂ 48 hours before the behavioural assays and a dot of white acrylic paint was applied on half of the tested flies on the dorsal thorax to facilitate visual tracking of individual flies. The other half was

anesthetized with CO₂ but were not painted. A cup (13x6mm) filled with standard food medium (food cup) and with a drop of yeast paste in the middle were used as an attractive resource in all fights, and was placed in the middle of the arena and fixed with adhesive paste. The arena was separated with a divider so both inserted flies could have access to half of the resource without being in physical contact with the other male. Subordinate males were defined as males that retreated at least 3 times from the food cup after receiving lunges from the opponent. After 20min of fight, the divider was inserted to separate dominants and subordinates. It was important to not stress flies by inserting the divider nor induce flight otherwise results might be biased. Then, after having being separated for 10 or 60 minutes after fighting experiences, dominants and subordinates were tested for their territoriality, locomotion, courtship and preferences assays described below. Males were tested only once for behavioural assays and one timing (10 or 60 minutes).

Territoriality assays. Directly after the 20min fights, an opaque divider was inserted within the arena to separate dominants and subordinates. Then, we recorded their territoriality on each side of the food cup during 5min. Territoriality of dominant and subordinate fly were scored in BORIS v.7.12.2 [34]. The time to return to the food cup and the time spent on it have been measured for 5min, both starting from the insertion of the divider. Some flies were already on the cup when we inserted the divider, we thus excluded these flies from the measure “Time to return to the food cup” on Fig 1B. The fly was considered on the food cup if at least three legs of the fly touched the cup or the food, edges of the cup included. It was then expressed in percentage of time spent on the territory.

Locomotion. After a period of 10 or 60min once the 20min fight has ended, dominants and subordinates were inserted alone in a novel arena without food resource and were allowed to acclimate for 1min. Then, the number of midlines crossing was counted during 5 minutes.

Courtship assays. After a period of 10 or 60min once the 20min fight has ended, dominants and subordinates were separated from each other by inserting a divider. Then, dominants, subordinates, and naïve males (males that were inserted within the same arena used for aggression assays, but alone) were transferred into one half of a new arena without food resource, but containing a living virgin CS female on the other half. Courtship Vigour Index (CVI) was calculated as $\frac{T_t + T_{UWE} + T_{Obs} + T_{Ch} + T_{ac}}{T_{Obs}}$ where T_t is the time the male did tapping, T_{UWE} the time of Unilateral Wing Extension (UWE), T_{Ch} the time of chasing, T_{ac} the time of attempted copulation and T_{Obs} the total time of the observation which was of 10min after the first courtship behaviour.

RESULTATS – Effets d'un combat sur les comportements reproducteurs

The latencies to court and to mate were the times between the first meeting (*i.e.* the first physical contact between both flies) and the first courtship behaviour or initiation of mating. The number of abdomen binding were counted and the reproductive success (*i.e.* mating before 10min) for each male was scored.

Male preference assays. After a period of 60min once the 20min fight has ended, dominant and subordinate males were inserted into a novel arena containing a food cup. On the food cup, a decapitated virgin CS female and a decapitated CS naïve male were placed. To decapitate Cs females and males, they were anesthetized within a clean cold vial for 30 seconds. Using a clean razor blade, we cut off the heads of the sleepy flies. Their body were then put on each side the food cup with clean forceps. Decapitation was used to score interacting time of the test fly itself without bias due to behaviours of target flies. The time spent to interact with each were quantified. The amount of time obtained allowed the calculation of an index representing the time spent with a preferred individual. A positive index of 1 would reflect that a given male spent all the observation time interacting with the immobilized female. Conversely, a negative one of -1 would reflect that the male spent all the observation time interacting with the immobilized and naïve male. The index was calculated as equal to $\frac{T_F - T_M}{T_{Obs}}$ where T_F is the total time spent with the female, T_M with the male and T_{Obs} the total time of the observation, everything being expressed in seconds.

Female preference assays. After a period of 60min once the 20min fight has ended, dominant and subordinate males were used for preference assays. In a new arena containing a food cup, one virgin CS female was inserted on one half of it. On the food cup, a decapitated dominant and subordinate were placed, using the same decapitation protocol described above. Once the divider was removed, the female was allowed to interact with immobilized males. As in the male preference assays, the time spent interacting with the dominant or the subordinate male allowed the calculation of an index reflecting the proportion of time and the preferred male, from -1 to 1. A positive index of 1 would reflect that female spent all the observation time interacting with dominants, while a negative one of -1 would reflect that they spent all her time interacting with subordinates. The index was calculated as equal to $\frac{T_W - T_L}{T_{Obs}}$ where T_W is the total time spent with the winner, T_L with the loser and T_{Obs} the total time of the observation, everything being expressed in seconds.

Courtship competition assays. Males fought during 20min to establish dominance relationship. They were then separated with the divider and kept in the same arena. After 60min,

a virgin female was inserted in arenas which met dominance criteria, randomly from the side of the dominant or subordinate. Then, the separator was immediately removed. Males were allowed to compete for the female until a male succeeded to mate with the female. The status of the first male displaying the first courtship event (*i.e.* one-wing extension), and the one which succeeded to copulate with the female were noted.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.2.1 (GraphPad Software, San Diego, California USA) and RStudio 2021.09.1+372. All data were subjected to a Grubb's test ($\alpha = 0.05$) to determine whether extreme values were outliers and were excluded from analysis. Since most of the datasets did not pass a Shapiro-Wilk normality test, non-parametric statistical tests were used for all our data analysis. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare data. Dunn's multiple comparisons test was used as a post-hoc test to determine which groups significantly differed. Survival analysis for CVI data ([S1 Fig](#)) were performed with RStudio by using survival and survminer packages and were compared using the log-rank test. Proportions (Figs [1A](#), [2E](#) and [3A](#)) were compared on RStudio by using Generalized Linear Model (GLM) following a binomial distribution and analysed with a Type-II ANOVA.

Results

Dominance status and territoriality

As a first step to investigate the influence of males' dominance status, we have assessed males' territoriality directly after 20min-fights. Following the separation of both opponents within the arena, we noticed a higher proportion of dominants already on the food cup when starting the assays compared to the losers ($\text{Chi}^2 = 4.2712$, $\text{df} = 1$, $p = 0.0388$) ([Fig 1A](#)). For flies that were not on the food cup at the start of the assays, we observed no significant difference in the time to return to the food cup between subordinates and dominants (Mann-Whitney test, $U = 69$, $p = 0.1038$) ([Fig 1B](#)). However, dominants spent significantly more time on the food cup than the subordinates during the 5min of observation (Mann-Whitney test, $U = 92$, $p = 0.0003$) ([Fig 1C](#)). The difference cannot be assigned to locomotor deficit as any statistical differences between winners and losers were observed when measured 10min or 60min after fights (Mann-Whitney test, 10min $U = 34.5$, $p = 0.6486$; 60min $U = 112$, $p = 0.9919$) ([Fig 1D](#)). These results

showed that winning a fight enhances males' attraction to the food cup and potentially their territoriality.

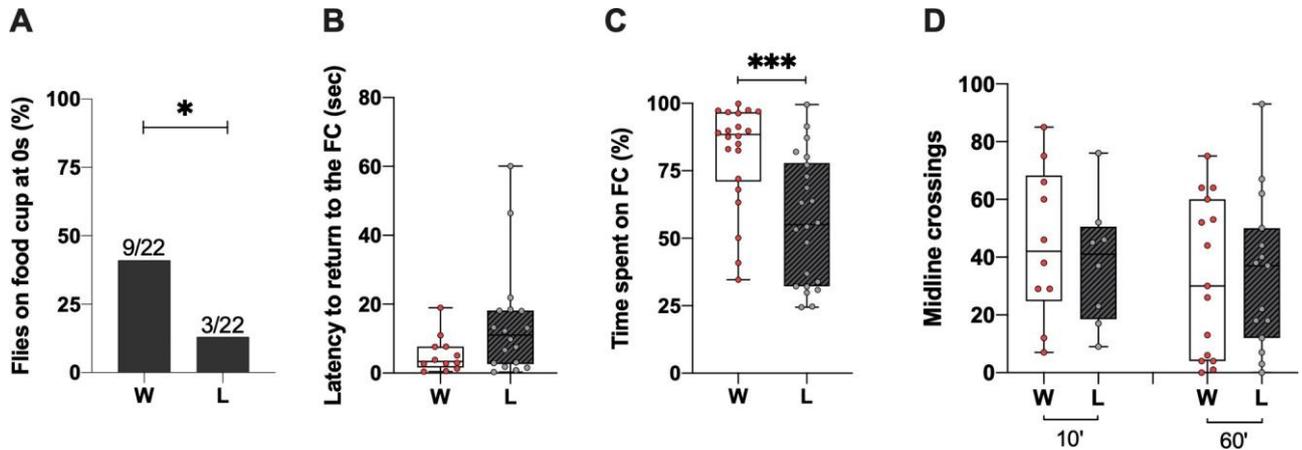


Fig 1. Previous defeat had negative impact on males' territoriality. (A) The proportion of flies starting the territoriality assays on the food cup was significantly larger in winners than losers (n = 22). (B) The time to return to the food cup was not significantly different between winners and losers (n = 22). (C) The proportion of time spent on the food cup was increased in winners compared to losers (n = 22). (D) The number of midline crossings 10 and 60min after fights was not different between losers and winners (10min: n>8; 60min: n = 15). N = Naïve, W = Winner and L = Loser. *p<0.05 **p<0.01; ***p<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839.g001>

Dominance status and courtship behaviour

Beside territoriality, the capacity to meet and court females to ultimately mate and produce offspring is crucial for animals' survival. To assess the influence of previous fighting experience on courtship and mating success, we performed male-male aggression assays followed by courtship assays by pairing independently previous winners and losers with a CS virgin female. The results revealed that previous losers showed a significant increase in their latency to court females compared to winner and naive males 60min after fights (Kruskal-Wallis test, $H = 10.68$, $p = 0.0048$ and post-hoc Dunn's multiple comparisons test $p_{\text{Naive}>\text{Losers}} = 0.0143$; $p_{\text{Winners}>\text{Losers}} = 0.0164$ and $p_{\text{Naive}>\text{Winners}} > 0.999$), but not after 10min (Kruskal-Wallis test, $H = 0.5570$, $p = 0.7569$) (Fig 2A). However, the latency to mate did not differ after both timings (Kruskal-Wallis test 10min, $H = 0.6380$ and $p = 0.7269$; Kruskal-Wallis tests 60min, $H = 1.177$, $p = 0.5552$) (Fig 2B). Similarly, the CVI which reflects the time spent by males courting females for 10min after the first courtship event, and the number of abdomen binding (AB) were not significantly different in their intensity (CVI: $H_{10\text{min}} = 0.5680$, $p = 0.7528$; $H_{60\text{min}} = 2.206$, $p = 0.3319$; AB: $H_{10\text{min}} = 1.421$, $p = 0.4914$; $H_{60\text{min}} = 0.6318$, $p = 0.7291$) (Fig 2C and 2D) nor in their extinction (10mn: $\text{Chi}^2 = 0.4$, $\text{Df} = 2$ and $p = 0.83$; 60mn: $\text{Chi}^2 = 3.5$, $\text{Df} =$

RESULTATS – Effets d'un combat sur les comportements reproducteurs

2 and $p = 0.17$) (S1A and S1B Fig). Then, to assess mating behaviours, we analysed the mating success and the persistence to mate. Both mating success and mating duration were not significantly different after both timings (mating success: $\text{Chi}^2_{10\text{min}} = 2.1898$, $\text{df} = 2$, $p = 0.3346$; $\text{Chi}^2_{60\text{min}} = 3.6535$, $\text{df} = 2$, $p = 0.1609$; Mating duration: Kruskal-Wallis test $_{10\text{min}}$, $H = 4.053$, $p = 0.1318$; $H_{60\text{min}} = 0.4939$, $p = 0.7812$) (Fig 2E and 2F). These results demonstrate that only previous losing experiences negatively affect males' motivation to court females 60 min after fights, but had no significant influences on other courtship and mating capacities.

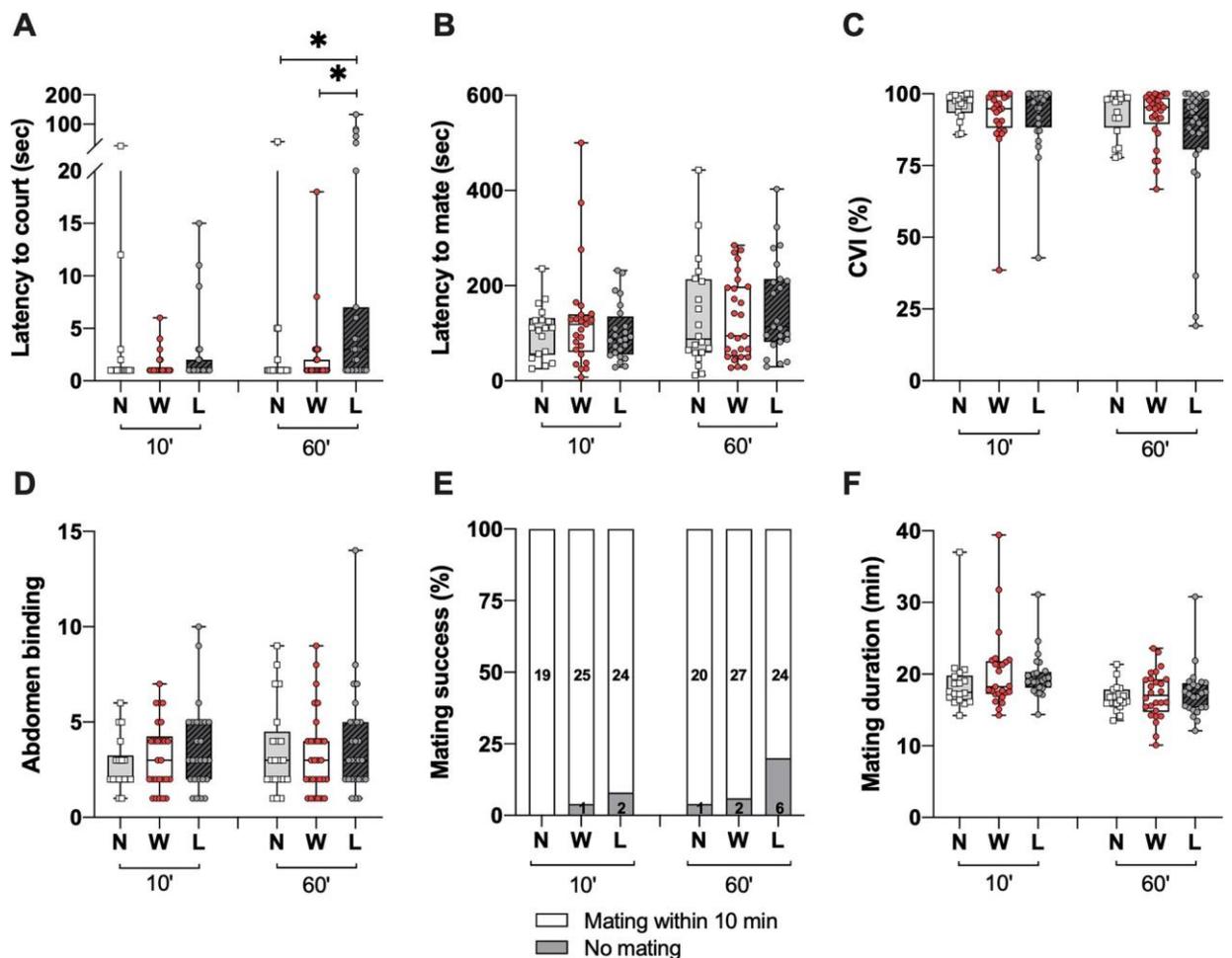


Fig 2. Losing fight influence males' motivation to court females. (A) The latency to court virgin CS females was significantly increased in losing males. However, the latency to mate (B), the Courtship Vigor Index (CVI) (C), the number of abdomen binding (AB) (D), the mating success (E) and the mating duration (F) were not significantly affected. (10min: $n_N = 19$ $n_W = 26$ $n_L = 26$; 60min: $n_N = 21$ $n_W = 29$ $n_L = 30$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839.g002>

Dominance status and reproductive success in a competitive context

Dominant and subordinate males did not present drastic differences in their abilities to court and mate, but a decreased in the subordinates’ motivation to court females 60 minutes after fights has been observed. Thus, we then asked whether dominance status would have an impact on reproductive success when the pressure of competition is strong. To tackle this, 60 minutes after fights, we inserted a CS virgin female within the arena and scored courtship behaviours from both males. In such context, we demonstrated that winners and losers had the same probability to perform the first courtship event ($\text{Chi}^2 = 0.5816$, $\text{Df} = 1$, $p = 0.4457$), whereas losers had a significantly lower probability to mate first compared to winner males ($\text{Chi}^2 = 7.9791$, $\text{Df} = 1$, $p = 0.0047$) (Fig 3A). Subordinates’ courtship performances were not quantitatively altered as their CVI did not differ significantly from that of the dominants, even though a trend can be noticed (Mann-Whitney test, $U = 350,5$, $p = 0.0649$) (Fig 3B). However, over time, the losers’ CVI shows a faster decline compared to that of the winners ($\text{Chi}^2 = 4.3$, $\text{df} = 1$, $p = 0.037$) (S1C Fig). This suggests that subordinates may displayed fewer UWE explaining their lower probability to mate. Yet, when they succeed, we found that the mating duration differed significantly, such that the winners had longer mating duration than the losers (Mann-Whitney test, $U = 55$, $p = 0.0348$) (Fig 3C). Our results showed that previous losing experiences have mostly negative consequences on reproductive success only when individuals face competitors.

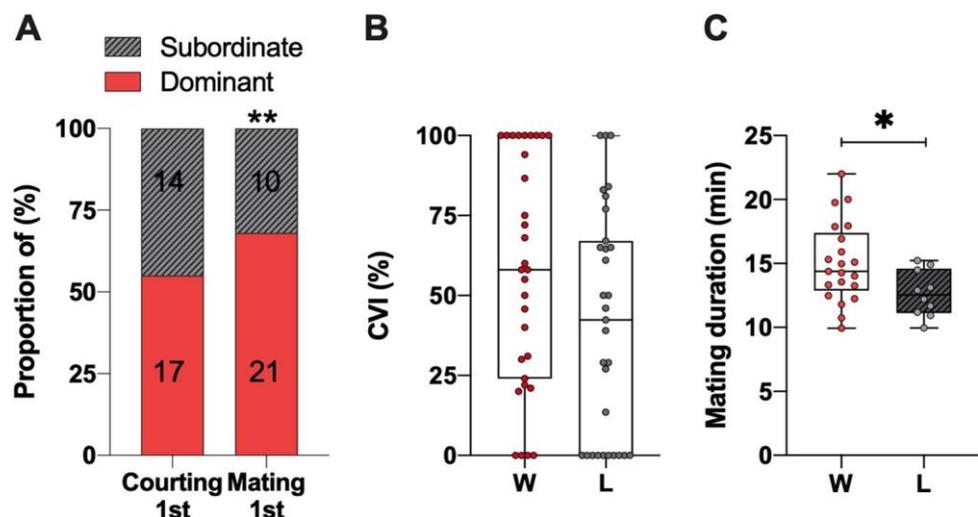


Fig 3. Previous losers were less likely to mate upon winners. (A) The likelihood to courting first the female was equivalent between winners and losers, however, previous winners had increased mating success (17 dominants did the first courtship behaviour versus 14 subordinates, and 21 dominants mated first versus 10 subordinates). (B) The CVI from dominants and subordinates were not statistically different from each other. (C) The mating duration was significantly longer for winners compared to losers $*p < 0.05$ ($n = 31$).

Males and females' preferences

To explain the lower reproductive success of subordinates in a competition context, we carried out preferences assays. First, a previous defeat may lead to an impairment of correctly identifying females or a reduction of motivation to interact, court and ultimately mate with females. To disentangle these points, 60 minutes after fights, previous winners and losers had the choice to interact with a decapitated CS virgin female or CS naïve male. Both winner and loser males showed a clear preference for interacting with the decapitated female, and the time of interaction did not differ between both males (Mann-Whitney test, $U = 6$, $p = 0.4127$). They also showed the same lack of interest for the decapitated naïve male (Mann-Whitney test, $U = 6$, $p = 0.4127$) (Fig 4A). As a consequence, the male preference index did not differ significantly between winners and losers (Mann-Whitney test, $U = 7$, $p = 0.5635$; $m_{win} = 0.91$, $sd_{win} = 0.12$ and $m_{los} = 0.86$, $sd_{los} = 0.14$) (Fig 4B). Second, females may be more receptive to dominant males' status, and would be more willing to mate with previous winners. To test this hypothesis, CS females were able to interact with decapitated winners and losers that have fought 60 minutes before, and we measured the time of interaction with both decapitated males. The results showed that females spend as much time interacting with winners as losers (MannWhitney test, $U = 203$, $p = 0.3664$) (Fig 4C), which is also outlined by a females' preference index around 0 ($m = -0.08$, $sd = 0.43$) (Fig 4D). These results suggest that previous defeat may directly impact males' motivation to court, and to the end, affect their reproductive success in a competitive context, rather than on females' preference for dominant males.

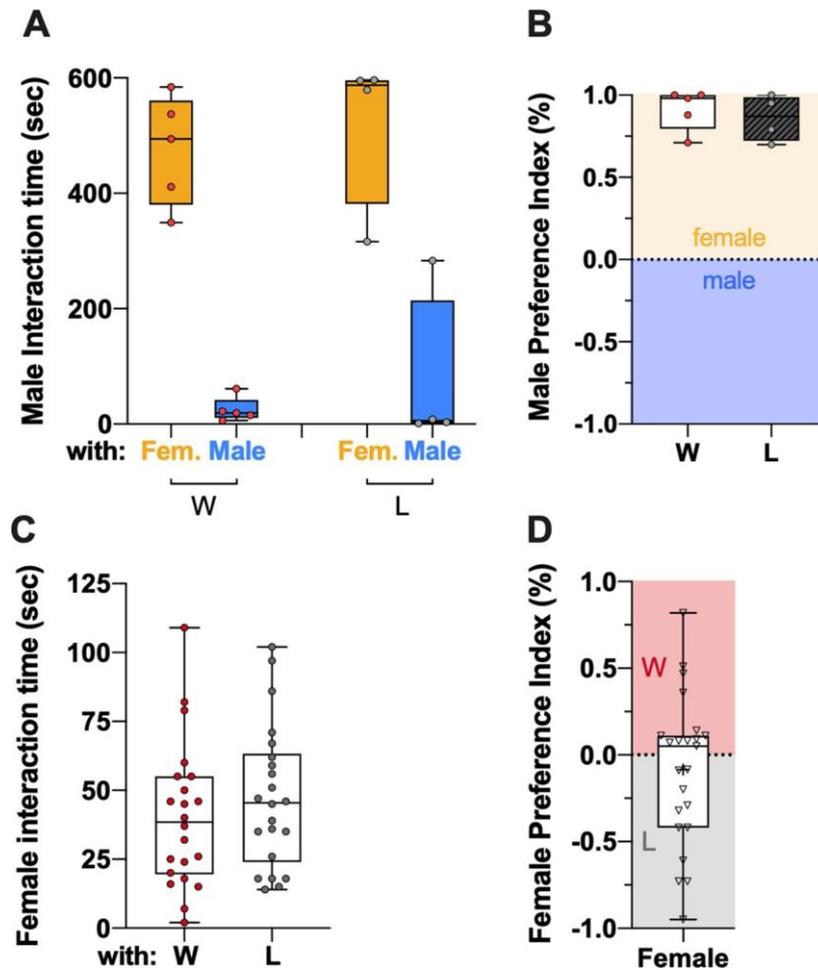


Fig 4. Previous fighting experiences did not alter males' perception for females. (A) Previous losers spend as much time than winners interacting with decapitated females. They spend more time interacting with females than males. (B) Male preference Index was equivalent between winners and losers ($n > 4$). (C) CS females spend as much as time interacting with decapitated winners and losers (D) Female preference Index is equivalent to zero, showing no preference for winner or loser males ($n = 23$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839.g004>

Discussion

The aim of our study was to determine the short-term effects of fights' outcome on some *Drosophila melanogaster* males' behavioural aspects that are considered as proxies for individual fitness. First, we examined the territoriality with respect to the contested resource when dominants and subordinates were physically separated directly after fighting experiences. 40% (9/ 22) of winners, but only 13% (3/22) of losers, were still present on the food cup at the beginning of the assays, meaning that they did not leave the food cup between the end of the fight and the start of the territoriality assays. This difference suggests that winners may demonstrate greater territoriality or motivation to access food compared to losers. When assessing the time it took for flies that were not initially on the food cup to return to it, no significant difference was observed between the two groups. However, defeated males tend to

take a longer period of time to return to the food cup compared to victorious males. Besides, despite the absence of physical contact with dominant flies during the territoriality assay, defeated males presented a reduced time spent on the food cup. Access and defence of a territory has been shown to be an advantage for males' reproductive success since females aggregate on it [35]. Therefore, the reduced territoriality behaviour of subordinates may directly lead to decrease likelihood to mate. Such results demonstrate that fights have rapid effects on individuals' behaviours that persisted even in absence of physical contact with their opponent. These observations were likely due to changes in internal state of flies induced by fighting experiences, as winning or losing fights did not impair males' locomotor activities nor sex-identification. Previous studies have shown that fighting strategy adopted by dominant and subordinate males is influenced by potential territory markings [36], implying that the social-cue theory would explain behavioural changes after fighting experiences. This theory entails that individuals are able to perceive environmental sensory cues deposited by the opponent to guide further behaviours and social interactions [37]. To test whether the social-cue theory would explain why subordinate males were less territorial because they could detect territorial markings left by dominants during fights, one could perform the same territoriality assays but in novel arena exempt of any males' pheromones cues.

We then assessed the courtship and reproductive behaviours of dominant, subordinate and naïve males at two different timings after a fighting experience, 10 and 60 minutes. Overall, no behavioural differences were statistically detected between the three groups of males 10 mins after fights. However, 60 mins after previous defeat, subordinates present a decreased in their motivation to court virgin females, and tend to display fewer UWE. This shows that previous defeat can affect males' behaviours at different timing scales, inducing immediate changes in term of territoriality, but short-term changes in term of motivational internal state that develop 60min after fights. However, courtship behaviours 10min after fights are not affected in losers. This could be explained by the fact that winning and losing experiences, as any social interactions and environmental changes, may induce specific quantitative changes in the cuticular profiles of winners and losers [38–40]. Such changes would require new synthesis of CHC in oenocytes, taking more than 10min. Quantitative modifications of some CHC may induce changes in self-perception and motivational states of the animals causing the increased latency to court females seen in our study, only 60min after fights. Our observation is consistent with others studies presenting evidence that defeated flies have a reduced motivation to court females [29] and to attempt copulation [27]. Besides, Filice and collaborators have revealed

that subordinates have a mating duration slightly increased compared to dominants but the average number of offspring sired by both males were equivalent [29], suggesting that males' fitness is not related to the time invested in the mating part *per se*. However, in our study, we found that mating duration was not different between subordinates and dominants in a noncompetitive context, while it was reduced in a competitive context. Such discrepancy could be explained by the different experimental protocols. Although different aggression and courtship assays protocols were used in these studies, the conclusion is consistent: previous defeat negatively affect courtship motivational state of males. Interestingly, multiple defeats have been shown to induce long-lasting loser effect that persist at least a day and dependent of *de novo* protein synthesis [11, 22]. In addition, Kim and collaborators have shown that multiple defeats also induce a reduction of courtship behaviours that can be observed after 1 day [22]. Put together, these results suggest that fighting experience can induce changes in males' internal state in both short- and long-term ways, depending on how many defeats animals have experienced.

In a competitive context where dominants and subordinates compete for a female, our findings align with the existing literature, confirming that prior fighting experience has an influence on reproductive success. However, in our study, the reproductive success of losers was significantly decreased only in a competitive context, suggesting a potential interaction between experiencing prior defeat and competing against an opponent for a female. This hypothesis can be reinforced by the fact that losers tend to i) show lower reproductive success in a non-competitive context, and ii) spend less time displaying UWE toward the female in a competitive context. This interaction -fighting experience/presence of opponent- could also explain why, in this competitive context, losers have same likelihood of courting first the female. Competing against an opponent for females could overcome the negative effect of prior defeat, and increase losers' motivation to court females. However, as subordinates tend to perform fewer UWE in a competitive context, they might be ultimately less likely to mate with the female. While we cannot completely rule out the possibility that initial intrinsic differences, such as distinct energetic resources or courtship abilities, existed between actual losers and winners in our study, Teseo et al. in 2016 [27] provided supporting evidence against this hypothesis. They measured courtship behaviours before and after fighting experiences and demonstrated that decrease in courtship performance were observed only after losing experiences. This supports the idea that our observations are experience-dependent.

A question still remains: What serves as a predictor of males' reproductive success? Is it the males' fighting performances themselves or their subsequent dominance status that influence their reproductive success? In any scenario, previous fighting experiences may have crucial direct or indirect impacts on behavioural and phenotypical traits involved in courtship and reproductive success of dominant and subordinate males perceived by females. Distinguishing between the influence of males' fighting experiences and mating choice of females is a complex task. While some studies suggest that previous fighting experience may impact males' motivation to court females [17, 27–29], some others show that these are some males' phenotypic traits perceived by females that explain differences in reproductive success after fights [23, 41]. In another context, such as eavesdropping situation, female can assess dominance status of males by having watched their aggressive interactions. This effect has already been reported in fish [42] or birds [43]. Even though female flies are fitted with social learning capacities and can base their mating choice according to other females mating choice [44], to date, there have been no studies examining whether female flies after observing male fights, can accurately gauge the dominance status of males, and subsequently exhibit a mating preference for dominant males.

Development of winner and loser effects can be accompanied by changes in the quantity of chemical or olfactory signals emitted, leading to communication of males' dominance status to potential rivals and mates. This, in turn, can influence further social interactions. This has been shown in snapping shrimp and crayfish, that males can assess dominance status of opponent using olfactory cues [37], or in rodents, that female can detect odours of less aggressive males [45]. Results of our study indicate that, under our experimental conditions, females did not show an active preference for either decapitated dominants or subordinates based on chemicals, physicals or behavioural traits. This suggests that mating success may not primarily hinge on females themselves, or that females rely on additional behavioural and sensory cues not available when males are decapitated. If females do have preferences for winners, it would likely be influenced more by behavioural cues (such as UWE and song quality) rather than intrinsic traits alone (such as pheromones, size, etc.), or possibly a combination of both. To explore this hypothesis, one can perform experiment inspired from Loranger & Bertram's work [25] to see whether females would show an active preference towards alive males by blocking physical contact between dominants, subordinates and females.

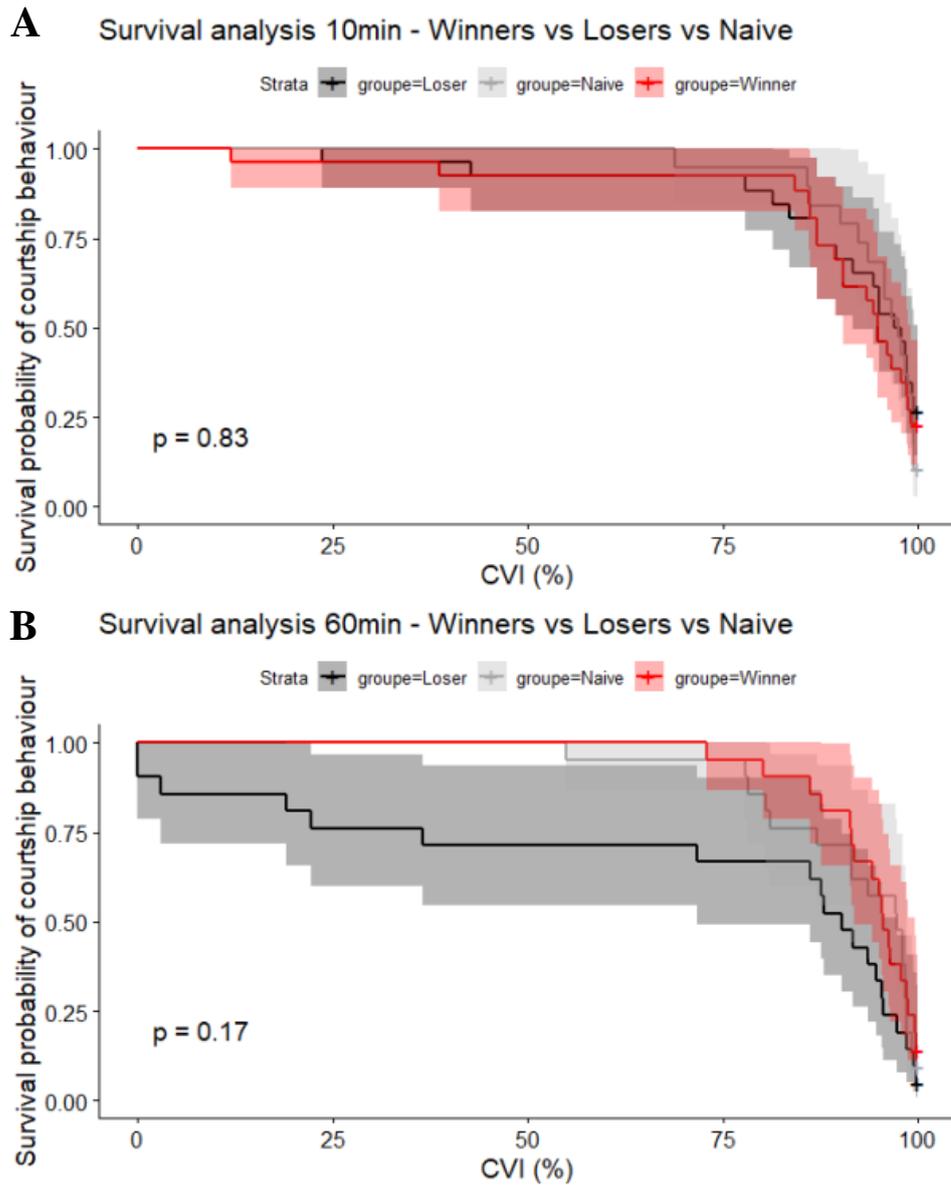
Other studies have examined how fighting experience can modulate female fertility and number of offspring produced. In crickets, it has been shown that females that mated with dominant males laid more eggs [46], suggesting that females can either allocate more energy after mating with dominants to produce offspring, or that dominant males can enhance offspring sired by females. Fighting experiences can also affect females' fertility through various mechanisms. *i.* Physiological effects: sperm quality of males can be altered by stress of aggressive interactions, potentially leading to fewer fertilized eggs after mating [47]. *ii.* Resource access: dominants would have better access to food, which can indirectly benefit females and their progeny [48] *iii.* Female choice: female preference for dominant may enhance female fertility by increasing the genetic quality of their offspring [49]. *iv.* Sperm competition: sperm of dominants may have competitive advantage in fertilizing eggs [50]. *v.* Territoriality: dominant males may create secure environments where females can raise their offspring more successfully, indirectly enhancing female fertility. *vi.* Males attractiveness: Females may be attracted to the displays and behaviours of males during fights, which can represent a signal of male quality, potentially increasing female interest and subsequently, fertility [51]. Collectively, these studies demonstrate how previous fighting experience significantly affect males' courtship behaviours, their reproductive success and their overall fitness, and might modulate female fertility. Nevertheless, it remains challenging to distinguish whether these impacts are direct or indirect, and whether they originate from males, females, or both.

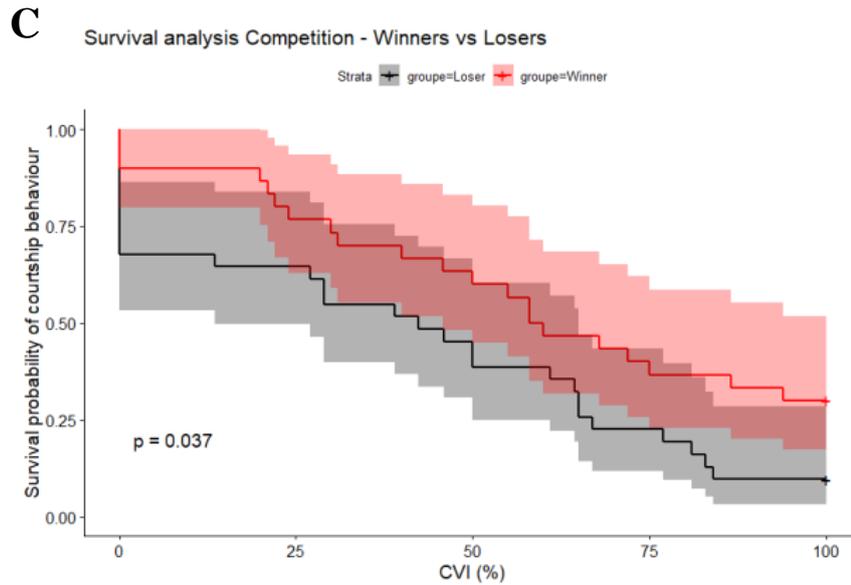
Conclusions

Fighting experiences may lead to deep changes in animals' behaviour and physiology. In general, consequences of previous defeats tend to be more profound, widespread and long-lasting than those of previous victories. Consistent with the existing literature, our findings in males *D. melanogaster* indicate that losing a fight leads to behavioural changes in subordinates: reduction in their territoriality, their motivation to court females, and their likelihood to mate in a competitive context. These effects can be observed at different temporalities, with an immediate impact on territorial defence, and after one hour on courtship and mating behaviours. However, fighting experiences have no influence either on males' ability to differentiate potential mates nor on females' choice to choose a mating partner. Overall, our findings contribute to a better understanding of how previous fighting experiences influence different behaviours that play a critical role in determining animals' fitness.

Supporting information

S1 Fig. The CVI extinction only differ in a competitive context. (A) The CVI extinction do not differ between Winners, Losers, Naïve 10min ($\text{Chi}^2 = 0.4$ and $p = 0.83$) and (B) 60min ($\text{Chi}^2 = 3.5$ and $p = 0.17$) after fight in non-competitive context. (C) However, CVI does decline faster in losers in competitive context against winners. [See below]





S1 File. Raw data collected from experiments. Each sheet corresponds to a figure. Outliers detected by Grubb’s test are in italic, blue and signalled with an *. Mean and Sd are calculated when it is possible. (XLSX)

Acknowledgments

We would like to thank members from the IVEP team at the Research Center for Animal Cognition for their comments on the manuscript. Especially, we would like to thank Anthony Defert (CRCA, Toulouse, France) and Anthony Roig (CNR, Istituto di Scienze e Tecnologie della Cognizione, Rome, Italy) who helped us with the statistical analysis, and thank the Edward Kravitz laboratory at Harvard Medical School (HMS, Boston, USA) for collecting preliminary results.

Author Contributions

Conceptualization: Severine Trannoy.

Data curation: Antoine Prunier, Severine Trannoy.

Formal analysis: Antoine Prunier, Severine Trannoy.

Funding acquisition: Severine Trannoy.

Project administration: Severine Trannoy.

Supervision: Severine Trannoy.

Writing – original draft: Antoine Prunier.

Writing – review & editing: Severine Trannoy.

References

1. Thoday JM. Components of fitness. 1953.
2. Blanchard DC, Blanchard RJ. What can animal aggression research tell us about human aggression? *Horm Behav.* 2003; 44: 171–177. [https://doi.org/10.1016/s0018-506x\(03\)00133-8](https://doi.org/10.1016/s0018-506x(03)00133-8) PMID: [14609539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14609539/)
3. Fernández MDLP Chan Y-B, Yew JY Billeter J-C, Dreisewerd K Levine JD, et al. Pheromonal and Behavioral Cues Trigger Male-to-Female Aggression in *Drosophila*. Waddell S, editor. *PLoS Biol.* 2010; 8: e1000541. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000541> PMID: [21124886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21124886/)
4. Hsu Y, Earley RL, Wolf LL. Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: mechanisms and contest outcomes. *Biol Rev.* 2005; 81: 33–74. <https://doi.org/10.1017/S146479310500686X> PMID: [16460581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16460581/)
5. Simon AF, Chou M - T., Salazar ED, Nicholson T, Saini N, Metchev S, et al. A simple assay to study social behavior in *Drosophila*: measurement of social space within a group ¹. *Genes Brain Behav.* 2012; 11: 243–252. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2011.00740.x> PMID: [22010812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22010812/)
6. Yamamoto D, Koganezawa M. Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. *Nat Rev Neurosci.* 2013; 14: 681–692. <https://doi.org/10.1038/nrn3567> PMID: [24052176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24052176/)
7. Chen S, Lee AY, Bowens NM, Huber R, Kravitz EA. Fighting fruit flies: A model system for the study of aggression. *Proc Natl Acad Sci.* 2002; 99: 5664–5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.082102599> PMID: [11960020](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11960020/)
8. Wang L, Anderson DJ. Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature.* 2010; 463: 227–231. <https://doi.org/10.1038/nature08678> PMID: [19966787](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19966787/)
9. Wang L, Han X, Mehren J, Hiroi M, Billeter J-C, Miyamoto T, et al. Hierarchical chemosensory regulation of male-male social interactions in *Drosophila*. *Nat Neurosci.* 2011; 14: 757–762. <https://doi.org/10.1038/nn.2800> PMID: [21516101](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21516101/)
10. Fernández MP, Kravitz EA. Aggression and courtship in *Drosophila*: pheromonal communication and sex recognition. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol.* 2013; 199: 1065–1076. <https://doi.org/10.1007/s00359-013-0851-5> PMID: [24043358](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043358/)
11. Trannoy S, Penn J, Lucey K, Popovic D, Kravitz EA. Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci.* 2016; 113: 4818–4823. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520953113> PMID: [27071097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27071097/)
12. Yurkovic A, Wang O, Basu AC, Kravitz EA. Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103: 17519–17524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608211103> PMID: [17088536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17088536/)
13. Page L, Coates J. Winner and loser effects in human competitions. Evidence from equally matched tennis players. *Evol Hum Behav.* 2017; 38: 530–535. <https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2017.02.003>
14. Kloke V, Jansen F, Heimig RS, Palme R, Lesch K-P, Sachser N. The winner and loser effect, serotonin transporter genotype, and the display of offensive aggression. *Physiol Behav.* 2011; 103: 565–574. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.021> PMID: [21549735](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21549735/)
15. Dijkstra PD, Schaafsma SM, Hofmann HA, Groothuis TGG. 'Winner effect' without winning: Unresolved social conflicts increase the probability of winning a subsequent contest in a cichlid fish. *Physiol Behav.* 2012; 105: 489–492. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.08.029> PMID: [21939680](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21939680/)
16. Drummond H, Osorno JL. Training siblings to be submissive losers: dominance between booby nestlings. *Anim Behav.* 1992; 44: 881–893. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80584-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80584-6)
17. Kola M, Alexander T, Servidio T, Mathews L. Winner and loser effects influence subsequent mating interactions in crayfish. *Behav Processes.* 2021; 192: 104489. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2021.104489> PMID: [34437979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34437979/)
18. Kasumovic MM, Elias DO, Sivalinghem S, Mason AC, Andrade MCB. Examination of prior contest experience and the retention of winner and loser effects. *Behav Ecol.* 2010; 21: 404–409. <https://doi.org/10.1093/beheco/arp204> PMID: [22476369](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22476369/)
19. Schwartz JJ, Ricci LA, Melloni RH. Prior Fighting Experience Increases Aggression in Syrian Hamsters: Implications for a Role of Dopamine in the Winner Effect: Dopamine Alterations in Trained Fighters. *Aggress Behav.* 2013; 39: 290–300. <https://doi.org/10.1002/ab.21476> PMID: [23519643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23519643/)
20. Fuxjager MJ, Trainor BC, Marler CA. What can animal research tell us about the link between androgens and social competition in humans? *Horm Behav.* 2017; 92: 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.014> PMID: [27914879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27914879/)
21. Hu SW, Yang YT, Sun Y, Zhan YP, Zhu Y. Serotonin Signals Overcome Loser Mentality in *Drosophila*. *iScience.* 2020; 23: 101651. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101651> PMID: [33117967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33117967/)
22. Kim Y-K, Saver M, Simon J, Kent CF, Shao L, Eddison M, et al. Repetitive aggressive encounters generate a long-lasting internal state in *Drosophila melanogaster* males. *Proc Natl Acad Sci.* 2018; 115: 1099–1104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716612115> PMID: [29339481](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29339481/)
23. Harrison LM, Jennions MD, Head ML. Does the winner–loser effect determine male mating success? *Biol Lett.* 2018; 14: 20180195. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0195> PMID: [29769302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29769302/)

RESULTATS – Effets d'un combat sur les comportements reproducteurs

24. Chan JPY, Lau PR, Tham AJ, Li D. The effects of male–male contests and female eavesdropping on female mate choice and male mating success in the jumping spider, *Thiania bhamoensis* (Araneae: Salticidae). *Behav Ecol Sociobiol.* 2008; 62: 639–646. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0488-x>
25. Loranger MJ, Bertram SM. The effect of male dominance on female choice in a field cricket (*Gryllus assimilis*). *Anim Behav.* 2016; 114: 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.01.020>
26. Amino K, Matsuo T. Reproductive advantage of the winners of male-male competition in *Drosophila prolongata*. *Behav Processes.* 2023; 206: 104831. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2023.104831> PMID: 36693576
27. Teseo S, Veerus L, Mery F. Fighting experience affects fruit fly behavior in a mating context. *Sci Nat.* 2016; 103: 38. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1368-x> PMID: 27108453
28. Toyoshima N, Matsuo T. Fight outcome influences male mating success in *Drosophila prolongata*. *J Ethol.* 2023; 41: 119–127. <https://doi.org/10.1007/s10164-023-00778-1>
29. Filice DCS, Dukas R. Winners have higher pre-copulatory mating success but losers have better postcopulatory outcomes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2019; 286: 20182838. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2838> PMID: 30940060
30. Van Lieshout E, Van Wilgenburg E, Elgar MA. No male agonistic experience effect on pre-copulatory mate choice in female earwigs. *Behav Ecol Sociobiol.* 2009; 63: 1727–1733. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0788-4>
31. Benelli G, Desneux N, Romano D, Conte G, Messing RH, Canale A. Contest experience enhances aggressive behaviour in a fly: when losers learn to win. *Sci Rep.* 2015; 5: 9347. <https://doi.org/10.1038/srep09347> PMID: 25792294
32. Hoffmann AA. The influence of age and experience with conspecifics on territorial behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Behav.* 1990; 3: 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF01049191>
33. Trannoy S, Chowdhury B, Kravitz EA. A New Approach that Eliminates Handling for Studying Aggression and the “Loser” Effect in *Drosophila melanogaster*. *J Vis Exp.* 2015; 53395. <https://doi.org/10.3791/53395> PMID: 26780386
34. Friard O, Gamba M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. Fitzjohn R, editor. *Methods Ecol Evol.* 2016; 7: 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
35. Hoffmann AA, Cacoyianni Z. Selection for territoriality in *Drosophila melanogaster*: correlated responses in mating success and other fitness components. *Anim Behav.* 1989; 38: 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(89\)80062-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(89)80062-4)
36. Trannoy S, Kravitz EA. Strategy changes in subsequent fights as consequences of winning and losing in fruit fly fights. *Fly (Austin).* 2017; 11: 129–138. <https://doi.org/10.1080/19336934.2016.1259041> PMID: 27834611
37. Rutte C, Taborsky M, Brinkhof MWG. What sets the odds of winning and losing? *Trends Ecol Evol.* 2006; 21: 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.014> PMID: 16701465
38. Farine J-P, Ferveur J-F, Everaerts C. Volatile *Drosophila* Cuticular Pheromones Are Affected by Social but Not Sexual Experience. Callaerts P, editor. *PLoS ONE.* 2012; 7: e40396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040396> PMID: 22808151
39. Ka'rapa'iti Z, Deutsch F, Kiss B, Schmitt T. Seasonal changes in photoperiod and temperature lead to changes in cuticular hydrocarbon profiles and affect mating success in *Drosophila suzukii*. *Sci Rep.* 2023; 13: 5649. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32652-y> PMID: 37024537
40. Kuo T-H, Yew JY, Fedina TY, Dreisewerd K, Dierick HA, Pletcher SD. Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 2012; 215: 814–821. <https://doi.org/10.1242/jeb.064980> PMID: 22323204
41. Hämäläinen A, Alatalo RV, Lebigre C, Siitari H, Soulsbury CD. Fighting behaviour as a correlate of male mating success in black grouse *Tetrao tetrix*. *Behav Ecol Sociobiol.* 2012; 66: 1577–1586. <https://doi.org/10.1007/s00265-012-1411-7>
42. Doutrelant C, McGregor P. Eavesdropping and mate choice in female fighting fish. *Behaviour.* 2000; 137: 1655–1668. <https://doi.org/10.1163/156853900502763>
43. Mennill DJ, Ratcliffe LM, Boag PT. Female Eavesdropping on Male Song Contests in Songbirds. *Science.* 2002; 296: 873–873. <https://doi.org/10.1126/science.296.5569.873> PMID: 11988564
44. Danchin E, Nöbel S, Pocheville A, Dagaëff A-C, Demay L, Alphan M, et al. Cultural flies: Conformist social learning in fruitflies predicts long-lasting mate-choice traditions. *Science.* 2018; 362: 1025–1030. <https://doi.org/10.1126/science.aat1590> PMID: 30498121
45. Ensminger AL, Meikle DB. Effects of male kinship and agonistic behaviour on reproduction and odour preferences of female house mice, *Mus domesticus*. *Anim Behav.* 2005; 69: 1147–1155. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.07.018>
46. Bretman A, Rodríguez-Muñoz R, Tregenza T. Male dominance determines female egg laying rate in crickets. *Biol Lett.* 2006; 2: 409–411. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0493> PMID: 17148416
47. Sapolsky RM. The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. *Science.* 2005; 308: 648–652. <https://doi.org/10.1126/science.1106477> PMID: 15860617
48. Clutton-Brock TH, Huchard E. Social competition and selection in males and females. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2013; 368: 20130074. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0074> PMID: 24167304
49. Andersson M. *Sexual Selection.* Princeton University Press; 1994.

RESULTATS – Effets d'un combat sur les comportements reproducteurs

50. Simmons LW. Sperm Competition and Its Evolutionary Consequences in the Insects. Princeton: Princeton University Press; 2002. <https://doi.org/10.1515/9780691207032>
51. Shuster SM, Wade MJ. Mating Systems and Strategies. Princeton: Princeton University Press; 2003. <https://doi.org/10.1515/9780691206882>

1.3. Discussion

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les conséquences d'un combat sur les comportements reproducteurs subséquents des mâles, sur quels mécanismes ces changements reposaient et au bout de combien de temps ils intervenaient.

Les principaux résultats de ce chapitre montrent que l'issue d'un combat semble avoir des répercussions différées sur le comportement des drosophiles mâles. En effet, nous constatons des effets instantanés sur la territorialité : les perdants vont moins rester sur le territoire malgré l'absence de contact physique avec le dominant. En revanche, concernant la reproduction, les effets ne sont visibles qu'au bout d'une heure. En dehors du contexte compétitif, les perdants ne montrent qu'une motivation réduite. Leur cour et leur reproduction est intact malgré des données qui semblent plus dispersées dans le groupe des perdants. En contexte de compétition, les écarts entre individus de statut social différent avantage les gagnants. Ceux-ci vont plus fréquemment copuler en premier et ont un temps de copulation plus long que les perdants. Les analyses de survie montrent que les perdants ont un CVI qui a une plus faible probabilité d'être d'une intensité élevée. Toutefois, la valeur moyenne du CVI ne diffère pas. Cela signifie que l'intensité du CVI ne diffère pas entre les groupes, par contre il est plus probable d'observer un CVI plus petit chez les perdants. Ces effets ne seraient dus ni à un défaut de détection des mâles, ni à une préférence des femelles compte tenu du résultat de nos tests de préférences.

Notons toutefois qu'hors compétition, nos résultats montrent que les distributions des valeurs observées chez les perdants sont plus dispersées, en particulier sur les paramètres de CVI et de durée d'accouplement. Cette variabilité pourrait être indicatrice d'une performance susceptible d'être altérée sous certaines conditions. En l'occurrence, lorsque les individus sont en compétition, ces plus grande variabilités révèlent une baisse significative de la probabilité d'observer un CVI élevé et de la baisse du temps de copulation chez les perdants à cause de l'interférence du comportement du gagnant une heure après la défaite. Cette question du délai est intéressante : pourquoi faut-il une heure pour observer ces effets ? Deux possibilités s'offrent à nous. 1) Il est possible que la différence soit due à des processus biologiques. Une victoire ou une défaite pourrait engendrer la synthèse de nouveaux hydrocarbures cuticulaires ou la modification de la quantité de HC déjà présents pourraient servir de signal évoquant le statut de la drosophile (Rutte et al., 2006). Elle pourra de fait adapter son comportement en conséquence en abandonnant la compétition plus tôt face à l'interférence du gagnant. 2) Le délais correspond au temps nécessaire à la drosophile pour former une mémoire et donc un

apprentissage. Les processus mnésiques à court terme, olfactifs aversifs notamment, exigent en effet un certain délais chez la drosophile (Davis, 2023; Pavlowsky et al., 2018). Ce délai est de l'ordre de la demi-heure ou de l'heure, et coïncide avec les résultats que nous observons. Au terme de cet apprentissage, la drosophile pourrait alors associer l'odeur de son adversaire via ses HC avec l'issue de son combat, la défaite. Or, nous savons que la défaite est aversive pour les drosophiles et mobilise le MBON-11 notamment (Kim et al., 2018). Apprendre de la défaite amène la drosophile à adapter son comportement en conséquence en favorisant l'évitement du dominant.

L'issue d'un combat génère des conséquences bénéfiques ou délétères potentielles sur la reproduction des individus. Il donc est crucial de comprendre les mécanismes fondamentaux régulant l'agressivité. Ce sera l'objet de notre deuxième chapitre.

2. Mécanismes neuronaux de régulation du comportement agressif

2.1. Introduction

Au cours de ce deuxième chapitre, nous avons voulu comprendre les mécanismes moléculaires et neuronaux intervenant dans la dérégulation des comportements agressifs. Nous l'avons vu en introduction générale, l'agressivité de la drosophile peut s'observer sous diverses formes et intensité que l'on simplifiera en trois niveaux : les menaces d'ailes (dissuasion), les attaques (*lunges*, attaques d'intensité normale) ou la boxe (attaques de forte intensité) (Chen et al., 2002). En règle générale, lorsque l'intensité des combats est normale, les *lunges* sont les comportements agressifs privilégiés. Mais exceptionnellement il arrive que de la boxe émerge, auquel cas la dominance n'est pas aussi nette à temps d'interaction égale (Trannoy, non publié).

Pour tenter de comprendre cette dérégulation, nous avons placé au cœur de nos recherches les VPM4 classiquement connu pour être octopaminergique. Il est connu que l'inhibition de l'activité des neurones OA diminue l'agressivité mais augmente la cour inter-mâles, pointant un rôle de l'activité OA dans le déclenchement des comportements agressifs (Andrews et al., 2014; Certel et al., 2007; Hoyer et al., 2008; Zhou et al., 2008). L'OA est aussi un neurotransmetteur déterminant pour les mâles dans le choix des comportements à adopter entre attaque ou cour, en permettant d'une part l'intégration des informations sensorielles, et d'autre part en interagissant avec les neurones P1 qui sont connus pour être le centre décisionnel des comportements motivés (Certel et al., 2007; Lee & Wu, 2020; Rings & Goodwin, 2019).

Toutefois, il a été récemment montré que près de trois quarts des neurones OA qui exprime VMAT, le transporteur vésiculaire des monoamines dont l'OA, expriment également dVGLUT, le transporteur vésiculaire du GLU de la drosophile (Sherer et al., 2020). Ces neurones à deux neurotransmetteurs pourraient alors utiliser l'OA et le GLU comme messagers pour interagir avec leur environnement neuronal (Sherer et al., 2020). Cette même étude a montré que l'inhibition de dVGLUT dans les neurones OA, qui a pour conséquence de réduire le relargage de la GLU dans ces neurones, réduisait l'agressivité sans impacter la cour, contrairement à l'inhibition du relargage d'OA. De plus, ils ont caractérisé particulièrement le VPM4 comme l'un de ces neurones OA-GLU. Dans la continuité des travaux de Sherer et collaborateurs, et en collaborations avec le laboratoire de Sarah Certel, nous avons voulu répondre à nos questions en investiguant le rôle du glutamate spécifiquement dans les VPM4 dans la régulation de

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

l'agressivité. Nous avons par la suite questionné sur quels neurones en aval les signaux du VPM4 pouvait agir pour réguler l'agressivité. Notre attention s'est alors portée sur les MBON-11 en tant qu'une des principales sorties des VPM4 d'après les données connectomiques (codex flywire Buhmann et al., 2019; Dorkenwald et al., 2023; Heinrich et al., 2018; Schlegel et al., 2023). Ce chapitre représente le cœur des travaux de ces trois dernières années. L'article est en préparation, et sera soumis pour publication très prochainement.

2.2. Article en préparation : Prunier, Sherer, Da Silva, Bihl, Certel & Trannoy

The GABAergic signaling pathway in MBON-11 is downstream of co-transmitting neurons and is required to prevent high-level of aggression in *Drosophila melanogaster*

Prunier Antoine¹, Sherer M Lewis², Mariana Da Silva¹, Bihl Léa¹, Certel J Sarah³ and Trannoy Séverine^{1*}

¹Research Center for Animal Cognition, Integrative Biology Center, Toulouse, France,

²Brown University, Dept of Neuroscience, Providence, RI,

³University of Montana, Neuroscience Program, Missoula, MT

* Corresponding author

Abstract

In competition for valuable resources such as food, mates and territory, most animal species, including *Drosophila melanogaster*, will respond with the use of aggressive behaviors. As aggression is an energetically costly behavior, it needs to be finely regulated. Previous studies identified the VPM4 octopaminergic neurons as crucial for regulating male-male aggression (Sherer et al, 2020). Moreover, it has been demonstrated that VPM4 neurons are dual-transmitting neurons, releasing both octopamine (OA) and glutamate to regulate aggression. In our study, we demonstrated that only the release of glutamate is crucial to regulate aggression. Using the connectome, we have identified one VPM4 post-synaptic neuron crucial for controlling high-intensity aggression, the MBON-11 neuron. Conditionally activating this MBON-11 results in hyperaggressive males. Furthermore, we have identified one glutamatergic receptor, $\text{GluCl}\alpha$, as modulator of MBON-11 synaptic activity to regulate male-male agonistic interactions. Our findings contribute to the existing understanding of the underlying mechanisms that support the regulation of appropriate aggressive behaviors.

Introduction

Aggression is an innate, complex, and widespread social behavior observed throughout the animal kingdom, but effecting particularly strong positive or negative consequences when displayed by humans. Natarajan & Caramaschi defined violence, *i.e.* abnormal and aberrant aggressive behaviors, as (1) out of control - unregulated -, (2) out of content - disordered and lacking structured sequences - and (3) out of context - arising from irrelevant environmental or physiological stimuli (Natarajan & Caramaschi, 2010). In this context, violent strategies are not evolutionarily stable, as demonstrated by evolutionary game theory studies (J. M. Smith & Price, 1973). Despite this, aggression remains an appropriate behavioral response in competition for limited and valuable resources such as food, mates, and territory. In animals, aggression can manifest as threats or physical confrontations to escalate. Given the high energetic costs and potential for severe injury associated with aggressive behavior, it must be finely regulated to ensure survival and fitness of individuals.

Aggression is a fundamental behavior with neural underpinnings that are inherently genetically hardwired. However, its expression is highly influenced by external sensory cues, past experiences, and the internal state of the individuals, highlighting its adaptability and flexibility properties. The ecological and ethological significance of aggressive behavior (species-typical aggression), however, has to be distinguished from the maladaptive one (hyper-aggression). While aggression has been extensively studied within psychopathological frameworks, our understanding of the neural circuits underlying hyper-aggression and the variability in aggressiveness among individuals remains limited. For neuroscientists, aggression represents an ideal model to explore neural plasticity, the genetic basis of behavioral decisions,

and the origins of dysregulated aggression, offering insights into evolutionary processes and behavioral regulation.

In mammals, factors such as social isolation (Matsumoto et al., 2005; Takahashi, 2022), early life stressors (Blanchard et al., 2001; Parise et al., 2023), selective breeding (Beilharz & Beilharz, 1975) and prior experiences (De Almeida et al., 2005) have been shown to enhance aggressive behavior. Similar to other psychopathologies, these factors affect key brain regions including the prefrontal cortex (PFC) and amygdala in both humans and primates (Xiong et al., 2023), as well as in rodents (Miczek et al., 2007). Other implicated areas are the hypothalamus, lateral septum, and the bed nucleus of the stria terminalis (Anholt & Mackay, 2012; Bartholow, 2018; Bergan, 2015; De Boer, 2018). Research indicates lower levels of monoamines in the PFC and amygdala of fight-experienced rats (Ferrari et al., 2003; Patki et al., 2015; Takahashi et al., 2011). Additionally, glutamate receptors in these areas are essential for regulating aggression (Yadav et al., 2012), and glutamate impacts aggression via the 5-HT system by activating the dorsal raphe nucleus in mice (Takahashi et al., 2015). In frontal regions like the lateral and medial orbital cortex and the infralimbic cortex, GABA, which is typically lower in violent rats, plays a regulatory role in aggression, suggesting a link between aggression and a lack of inhibitory control (Halász et al., 2006). Moreover, increased noradrenergic transmission is observed in the medial PFC of socially isolated rats displaying heightened aggression (Kawanabe et al., 2023) and in aggressive rats following social defeat (Patki et al., 2015). Collectively, these findings underscore the involvement of extensive brain circuits in mediating aggression, modulated by diverse neurotransmitter systems in vertebrates.

The present study aims to explore the neural mechanisms underlying aggression in an invertebrate model, *Drosophila melanogaster*. The primary advantage of using *Drosophila* as a model organism is the extensive and robust array of genetic tools available, which allow for precise manipulation and analysis of gene function and neural circuits related to aggressive behavior. This approach offers a valuable framework for uncovering the fundamental neuronal substrates that drive aggression in invertebrates.

A pioneering study by Sturtevant in 1915 was among the first to document fighting behavior in *fruit flies* (Sturtevant, 1915), but it was not until 1975 that Dow and Schilcher detailed male-male aggressive interactions in *D. mel* (Dow & Schilcher, 1975). Their study found that the most aggressive males secured better access to females and food, highlighting that increased aggression confers significant fitness advantages, such as territory possession (Hoffmann, 1990). Modern studies have developed comprehensive ethograms that thoroughly

describe the sequence of aggressive actions in *D. mel.* While the methodology for studying these behaviors is generally standardized, there are minor yet significant differences in the analysis and protocols used across studies (Trannoy et al., 2023). Briefly, male flies are competing in arenas for food resource. After couples of meetings between opponents, one male fly will display either wing threats (raising both wings at 45°C) or lunges (standing on hind legs and snapping down on the opponent), which usually compel the opponent to retreat from the contested resource. Such repeated aggressive displays frequently lead to the establishment of dominance hierarchies (Yurkovic et al., 2006). Occasionally, conflicts may escalate into intense confrontations known as "boxing," where both flies simultaneously lunge at each other. This phenomenon is considered one of the most extreme forms of aggression in this species. To delve into the origins of hyperaggression, three research groups have selectively bred male flies over several generations to create hyperaggressive lines that exhibit frequent "boxing" behavior (Chowdhury et al., 2017; Dierick & Greenspan, 2006; Edwards, 2007). In the most recent study, transcriptomic analyses of hyperaggressive lines revealed differential expression of nine genes compared to the Canton-Special (CS) control flies, highlighting potential genetic contributors to the heightened aggressive behaviour (Chowdhury et al., 2017). While the fundamental mechanisms regulating normal, species-typical aggression are becoming increasingly well-understood, the processes underlying the transition to dysregulated aggression remain poorly elucidated.

In the brain, monoaminergic circuits are among the primary mechanisms regulating male-male aggression. Key neurotransmitters involved in this regulation include serotonin (Alekseyenko et al., 2014), dopamine (Alekseyenko et al., 2013), and GABA (Sengupta et al., 2022), each playing significant roles in modulating aggressive behaviors. Moreover, neurons that use octopamine (OA) - a neurotransmitter analogous to norepinephrine in vertebrates - are critical in governing the balance between aggression and courtship behaviors in males (Certel et al. 2007). Research has demonstrated that reduced OA activity is associated with decreased aggression (Andrews et al., 2014; Hoyer et al., 2008; Zhou et al., 2008). However, increasing OA activity has yielded inconsistent effects on aggression levels (Asahina, 2017). Recent findings have revealed that many OA neurons co-express the vesicular glutamate transporter (VGLUT) and may also use glutamate as a neurotransmitter (Sherer et al., 2020). This suggests a more complex neurochemical role for OA neurons in regulating aggression, potentially involving glutamatergic signaling. The same study showed that the Ventral Paired Median 4 neurons (VPM4) are key dual-transmitting neurons among OA-expressing neurons. Dual-

transmission is well-documented in vertebrates, and occurs in various neuronal populations, including GABAergic, dopaminergic, and serotonergic neurons (for review see El Mestikawy et al., 2011). This dual-transmission mechanism allows for the selective release of either neurotransmitter, their co-release, or vesicular synergy. Vesicular synergy refers to the presence of one neurotransmitter enhancing the concentration of the primary neurotransmitter in the synaptic vesicle, thereby modulating the overall neurotransmission dynamics (El Mestikawy et al., 2011). Recent studies have shed light on the cellular mechanisms of dual co-transmission, but its behavioral implications remain a complex and compelling research area. Investigating how co-transmission influences behavior is crucial for understanding its role in both species-typical and pathological conditions.

Based on current connectomic data, one of the primary outputs of VPM4 neurons is the Mushroom Body Output Neurons MBON-11 neurons (codex Flywire, Buhmann et al., 2019; Dorkenwald et al., 2023; Heinrich et al., 2018; Schlegel et al., 2023). MBON-11 neurons synthesize and use GABA as neurotransmitter, as indicated by the expression of GAD1 (Perisse et al., 2016). Anatomically, MBON-11 is one of the few MBONs that form negative feedback loops back to the mushroom bodies (MB). Additionally, MBON-11 form auto-synapses, providing a mechanism for negative feedback control to regulate its own activity (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Dorkenwald et al., 2023; Schlegel et al., 2023). Functionally, MBON-11 has already been involved in both appetitive and aversive olfactory memories (Kim et al., 2018; König et al., 2019; Pavlowsky et al., 2018; Perisse et al., 2016), and its activity is potentialized by starvation which facilitates appetitive memory formation (Perisse et al., 2016). A recent study demonstrated that *Drosophila* can associate odors with positive or negative valence based on their experiences during a fight. The authors showed that loser flies tend to associate the paired odor with a negative valence, while winners assign a positive valence to the same odor. In addition, they identified MBON-11 neurons as crucial for this process, mediating the assignment of valence (positive or negative) to odors depending on the experience of the flies during the fight (Kim et al., 2018). In the context of tracking food odors, VPM4 neurons have been shown to inhibit MBON-11 activity, thereby reducing food-seeking behavior in favor of promoting feeding behaviors (Sayin et al., 2019; Youn et al., 2018). This indicates not only an anatomical but also a functional connection between VPM4 and MBON-11. Transcriptomic data indicates that MBON-11 expresses glutamatergic receptors, specifically the excitatory NMDAR2 and the inhibitory GluCl α , as well as GABA receptors (Rdl), but does not express octopamine (OA) receptors (Aso et al., 2019). Therefore, the

functional connection between VPM4 and MBON-11 likely involves glutamate release from VPM4.

In light of these findings, the dual-transmitting properties of VPM4 neurons remain a key question, particularly in relation to aggression. The aim of the present study was to determine a functional connection between VPM4 and MBON-11 and to assess the contribution of octopamine (OA) and glutamate (GLU) release from VPM4 in regulating goal-directed behaviors, such as male-male aggression. Our findings contribute to the existing understanding of the underlying mechanisms that support the regulation of appropriate aggressive behaviors.

Materials and Methods

Fly strains

To specifically target the MBON-11, VPM4 and MBON-5, we used the MB112C Split-GAL4, the MB113C Split-GAL4 and the MB298B Split-GAL4 lines (Aso, Hattori, et al., 2014). The UAS lines used for the study were the UAS-dTrpA1 (from Kravitz's lab), UAS-Shibire^{ts} (from Kravitz's lab), UAS-VGLUT (Bloomington 81119), UAS-RNAi mGluR (Bloomington 34872), UAS-RNAi NMDAR1 (Bloomington 25941), UAS-RNAi NMDAR2 (Bloomington 40846), UAS-RNAi GluCl α (Bloomington 53356), UAS-GAD1 (Bloomington 93606), UAS-RNAi GABA-T (Bloomington 54993), UAS-RNAi GAD1 (Bloomington 51794), UAS-RNAi VGAT (VDRC 103586), UAS-RNAi Rdl (Bloomington 52903), and UAS-RNAi GABA_B-R3 (Bloomington 50622).

Flies housing

All flies were reared on standard cornmeal-based fly food. Unless otherwise noted, all flies were raised and housed in incubators at 20°C ~50% relative humidity and a 12:12 hours light:dark cycle with white LED strips. Flies used for behavioral assays were isolated at the late pupae stage by placing them in plastic vials containing 1ml of standard fly food. Isolated flies with the UAS-dTrpA1 reporter were reared at 20°C for 7 days before aggression assays, while flies with UAS-RNAi, UAS-VGLUT and UAS-VMAT were reared at 20°C for 4 days, and then transferred to 25°C for the remaining 3 days prior to the aggression assays.

Aggressive behavioral assay

Aggression assays were performed with 7 days-old flies between 09:00 and 12:00 which corresponds to ZT0 to ZT3. For experiments with UAS-dTrpA1 containing males: arenas were placed in an incubator at 29°C (or 20°C for control experiments in Fig Supp 2) the day before the assays. For experiments with UAS-RNAi, UAS-VGLUT and UAS-VMAT: arenas were placed in an experimental room at 25°C the day before the assays. In all assays, flies were inserted inside the arenas for 10 minutes of acclimation before the start of the experiment.

Behavioral assays were performed in sliding arenas (22mm diameter x 16mm height) previously described in Trannoy et al. (2015). A food cup (13x6mm) was placed in the center of the arena, filled with standard fly food and a drop of rehydrated yeast in the center. An opaque divider was inserted from the cover to separate the arena in two equal sizes. Males (and females for Fig Supp 3) were inserted by negative geotaxis on each side of the arena. After 10 minutes of acclimatisation, the divider was removed and flies could start interacting. Social interactions were recorded for 35 minutes with Basler Pylon 5.x cameras. The first meeting, the number of lunges and the number of boxing events were scored semi-automatically with BORIS v.8.21.5. (Friard & Gamba, 2016). The numbers of lunges and boxing events were scored for 5 minutes after the 1st lunge. If no lunge occurred for 15 min after the first meeting, we scored this as a fight without lunges.

Results presented in Fig 1J and K, Fig 2B and C and Fig Supp 4 were performed in the divider chamber described in Trannoy et al, 2023. Results found in Fig 4A-C and Fig Supp 5 were performed in the divided behavior chambers as previously described (Chowdhury et al., 2021). Behavior chambers were assembled on clear agarose with a yeast/sucrose-based food top and placed on top of an LED light pad (AGPtek). Pairs of 5–7 day old, socially naïve adult males were aspirated into the divided behavior chambers and left for a period of at least 24 hours to allow for recovery from anesthetization. Fly movements were tracked using CalTech FlyTracker 1.0.5 (Eyrún Eyjólfsdóttir & Pietro Perona, Caltech, available for download at <http://www.vision.caltech.edu/Tools/FlyTracker/>) and lunges were subsequently quantified using the Janelia Automatic Animal Behavior Annotator (JAABA) (Kabra et al., 2013). The lunge classifier (Certel_lungeClassifier.jab) was designed in JAABA (referencing human-scored data) and used to detect lunges from individual flies. Annotated frames were post-processed in JAABA with the internal post-processing filter set at 0.06, a value that provided the best signal-to-noise ratio *a posteriori* for lunge classification. An additional post-processing filter was applied in MATLAB using JAABA post-processed files in combination with tracking

data to eliminate misclassified lunges detected at a distance of two or more fly body lengths. Total number of lunges, wing threats, and unilateral wing extensions were scored for a period of 30 minutes after the first lunge using a custom MATLAB script (analysis.m). The time between the beginning of the video recording and the first lunge was used for calculating the latency to lunge. Inter-male courtship was defined as the number of unilateral wing extensions (singing) followed by additional courtship behaviors (licking, abdomen bends, repeated wing extensions, etc.) (Yamamoto & Koganezawa, 2013). Holding and boxing were scored for a period of 10 mins after the first lunge as described previously (Penn et al. 2010; Davis et al. 2018). All graphs were generated with Prism (GraphPad Software) and Adobe Illustrator CS6 (Adobe). For data that did not meet parametric assumptions, a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison was used unless otherwise specified. A Mann-Whitney test was performed in the case of two category comparisons.

Immunocytochemistry

Adult male dissected brains were fixed in 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 25 minutes and labeled using a modification of protocols previously described (Certel et al., 2010). The following primary antibodies were used: anti-bruchpilot (mAb nc82, 1:30, Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the Department of Biology, University of Iowa (Iowa City, IA).), monoclonal rabbit anti-GFP (1:200, Molecular Probes), rat anti-HA 3F10 (1:100, Roche), mAb dVGLUT (1:15, Sherer et al., 2020), rat anti-V5 (1:200, Biorbyt), and rabbit anti-mCherry (1:350, Abcam). Secondary antibodies conjugated to Alexa 488, Alexa 594, or Alexa 647 (Molecular Probes) were used at a concentration of 1:200. Labelled brains were mounted in Vectashield (Vector Labs, #H1000). Images were collected on Zeiss 880 laser scanning confocal microscopy system and processed using ImageJ (NIH) and Adobe Photoshop (Adobe, CA).

Statistical Analysis

GraphPad Prism 8.2.1 (for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) and RStudio 2021.09.1+372 were used for statistical analysis. Outliers were identified with a Grubb's test ($\alpha = 0.05$). These extreme values were removed from the

analysis. Most of our datasets did not pass the normality test (Shapiro-Wilk), we therefore used the non-parametric Kruskal-Wallis statistical test. Dunn's multiple comparisons test was employed as a post-hoc test to compare which groups significantly differed from the others. Proportions were analysed thanks to generalized linear model for binomial data with an analysis of deviance table (Type II tests). For post-hoc comparisons, α threshold was corrected with a sequential Bonferroni correction after Benjamini-Hochberg on R v.4.1.2 (R Core Team, 2020). Package car was used (Fox & Weisberg, 2019).

Results

Glutamate from VPM4 is required to induce high intensity aggression

The Ventral Paired Medium 4 (VPM4) neuron pair was originally characterised as octopaminergic, but later found to express both the vesicular monoamines transporter VMAT and the vesicular glutamate transporter VGLUT (Sherer et al., 2020). VPM4 is located in the subesophageal zone (SEZ), a region important for processing gustatory and pheromonal sensory information, and arborizes to the antennal lobe and the γ -lobe of the mushroom body. VPM4 has previously been implicated in switching between odour seeking and feeding reward and initiating feeding via proboscis extension in response to sucrose reward. Its critical role in determining resource value suggests that it may function in multiple decision-making circuits, including those that promote aggressive behavior in the context of acquiring and/or defending food resources.

To test this hypothesis, we first activated VPM4 neurons by expressing the thermosensitive transient receptor potential A1 (TrpA1) ion channel under control of the VPM4-specific Gal4 driver, (MB113C-split-Gal4, hereafter referred to as MB113C). Since TrpA1 is activated directly by temperatures in the warm range, shifting MB113C/TrpA1 adult males from 20°C to 28°C activates the VPM4 neurons allowing us to determine if these neurons are required for aggressive behavior. Fights between pairs of MB113C/TrpA1 males, and transgenic controls were recorded and multiple agonistic parameters quantified, including the latency to the first lunge, number of lunges, and number of boxing events (Fig 1). As behavioral patterns are scored for 30 minutes after the first lunge, each male pair has the same amount of time to exhibit aggressive events.

Conditional activation of VPM4 resulted in males initiating fighting, as measured by the medium-intensity aggression pattern, lunging (Chen et al., 2002), significantly faster than controls (Fig 1A). Although the number of lunges in the experimental males compared to controls did not differ (Fig 1B). However, enhanced VPM4 activity resulted in a significant increase in both the number and frequency of high-intensity boxing events (Fig 1C and D), with 58% of the pairs (11 out of 19) engaging in at least one boxing event during the five-minute observation period. Boxing did not occur at the non-activation temperature (20°C) (Fig Supp1). These results demonstrate that the VPM4 neurons do indeed promote male aggression, leading to the next question on whether glutamate or octopamine or both neurotransmitters signal elevated aggression levels.

As established previously by Sherer et al. (2020), the VPM4 neurons are co-transmitting neurons, expressing both the vesicular glutamate transporter (VGLUT) and the vesicular monoamine transporter (VMAT), required machinery for packing glutamate and octopamine (OA) respectively. To determine which neurotransmitter was mediating the increase in high-intensity aggression, we increased the expression of VGLUT and VMAT solely in VPM4 neurons. Males with elevated VGLUT levels in VPM4 neurons (VPM4/VGLUT+) displayed a significantly increased number and frequency of boxing events as compared to controls, specifically 58% of VPM4/VGLUT+ male pairs exhibited at least one boxing event whereas transgenic control pairs exhibit 5 and 0% (Fig 1E and F). In contrast, enhancing octopamine packaging did not result in changes in male aggression (Fig 1G and H).

Figure 1

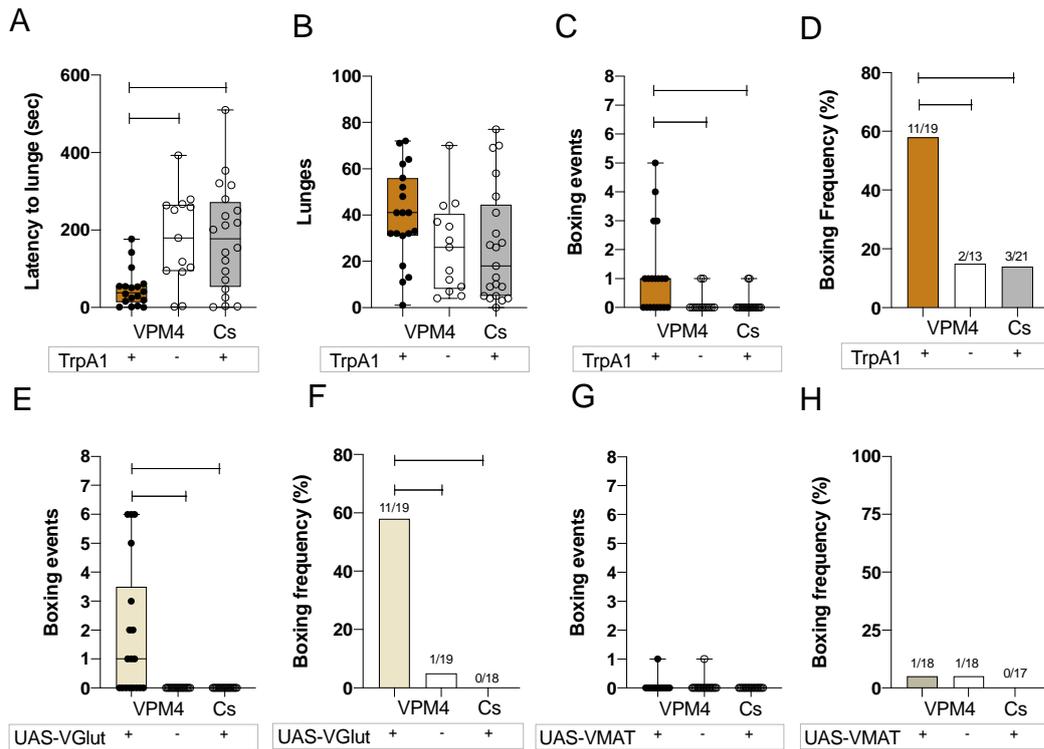


Figure 1: Glutamatergic signalling from VPM4 regulates high-intensity aggression.

(A) Conditionally activating VPM4 with dTrpA1 decreased the latency to lunge (Kruskal-Wallis $H=13.07$, $p=0.001$; Dunn's test with VPM4/+ $p=0.007$ and +/dTrpA1 $p=0.005$). (B) The number of lunges is nearly but not statistically different between genotypes (Kruskal-Wallis, $H=5.309$, $p=0.070$). (C) The number of boxing events is increased when VPM4 is activated compared to controls (Kruskal-Wallis, $H=13.24$, $p=0.001$; Dunn's test with VPM4/+ $p=0.019$ and +/dTrpA1 $p=0.002$), (D) as well as the boxing frequency in the VPM4/dTrpA1 (Analysis of deviance type II $\chi^2=11.488$, $Df=2$, $p=0.003$; χ^2 post-test_{VPM4/dTrpA1 & VPM4/+} = 6.203, $Df=1$, $p=0.0128$; χ^2 post-test_{VPM4/dTrpA1 & +/dTrpA1} = 9.792, $Df=1$, $p=0.0018$) (E) Over-expression of VGLUT in VPM4 led to significantly higher boxing events (Kruskal-Wallis $H=23.78$, $p<0.0001$, Dunn's tests with VPM4/+ and +/UAS-VGluT $p<0.0001$) and (F) significantly increases boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=24.494$, $Df=2$, $p<0.001$; χ^2 post-test_{VPM4/UAS-VGluT & VPM4/+} = 13.7, $Df=1$, $p<0.001$; χ^2 post-test_{VPM4/UAS-VGluT & +/UAS-VGluT} = 19.169, $Df=1$, $p<0.001$). (G) However, over-expressing VMAT in VPM4 did not influence the number of boxing (Kruskal-Wallis $H=0.963$, $p=0.618$), (H) nor the boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=1.584$, $Df=2$, $p=0.453$). (I) Downregulation of pre-synaptic mGluR in VPM4 increases the number of boxing event (Kruskal-Wallis $H=17.20$, $p=0.0002$; Dunn's test VPM4/+ $p=0.0002$ and +/RNAi-mGluR $p=0.019$). (J) and the boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=16.343$, $Df=2$, $p=0.0003$; χ^2 post-test_{VPM4/RNAi-mGluR & VPM4/+} = 15.659, $Df=1$, $p<0.001^{***}$; χ^2 post-test_{VPM4/RNAi-mGluR & +/RNAi-mGluR} = 7.212, $Df=1$, $p=0.007^{**}$; χ^2 post-test_{VPM4/+ & +/RNAi} = 0.083, $Df=1$, $p=0.773$).

Figure Supp 1

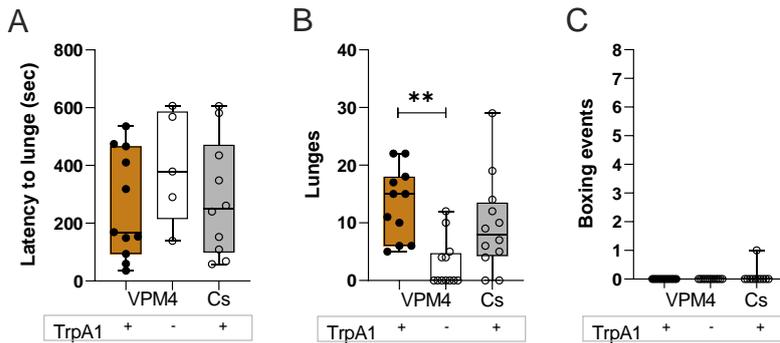


Fig Supp 1: At non-permissive temperature (20°C), experimental males don't express high-intensity aggression.

(A) When experiments are done at non-permissive temperature, the latency to lunge is not affected (Kruskal-Wallis, $H=1.669$ $p=0.434$). (B) VPM4/+ control males give less lunges than VPM4/dTrpA1 (Kruskal-Wallis $H=13.71$, $p=0.001$, Dunn's test $p=0.0008$). (C) The number of boxing events is not different between groups (Kruskal-Wallis $H=2.091$, $p=0.351$).

VPM4 synaptically connects to MBON-11

VPM4 extends arborizations to higher brain regions such as the subesophageal ganglion, the periesophageal neuropil, and the γ -lobe of the mushroom body (Burke et al., 2012; Busch et al., 2009; Sayin et al., 2019; Youn et al., 2018). Using a recently-published EM connectome of a partial female adult *Drosophila* brain (Zheng et al., 2018), we examined VPM4 innervation to identify potential downstream neurons that might be part of an aggression circuit. We identified a mushroom body output neuron, MBON-11, as a potential downstream partner due to the relatively high number of synaptic contacts formed (MBON-11 is the neuron with the fourth-highest number of post-synapses with VPM4) (Sayin et al. 2019) and its location in the γ -lobe of the mushroom body, a region which has previously been shown to modulate arousal threshold, olfactory learning, and salience-based decision making (McGuire et al. 2001; Zhang et al. 2007; Aso et al. 2014; Vogt et al. 2014; Awata et al. 2019).

The VPM4 postsynaptic target neuron, MBON-11, promotes hyper-aggressivity

To assess the role of the MBON-11 we used the MB112C-Split-Gal4 line known to specifically target the pair of MBON-11 neurons (Aso et al, 2013). We expressed dTrpA1 in

these neurons and conducted male-male aggression assays. Consistent with observations in VPM4, conditional activation of MBON-11 did not lead to an increase in lunge number (Fig 2A). However, we noted that these males often exhibited lunges outside the food cup, a behavior not observed in the control groups (Fig 2A). When we considered lunges both on and outside the food cup together, the total count of lunges did not show a significant increase, although there was a noticeable trend (Fig 2A). Consequently, we chose to analyse the number of lunges occurring outside the food cup prior to the first one on it. This analysis revealed that the frequency of such behavior was higher compared to both genetic controls (Fig 2B).

Activating MBON-11 led to flies exhibiting boxing behaviors both on the territory and outside, with an overall increase observed (Fig 2D). Consistent with these findings, there was a significant rise in boxing frequency, with 81% (25 out of 31 pairs) of the tested dyads displaying at least one boxing event (Fig 2D). When experiments were conducted at lower temperatures, behaviors were not affected (Fig Supp 2). Increased levels of aggression were observed exclusively in male dyads, as pairings between females did not result in altered behaviors (Fig Supp 3). Then, we aimed to determine whether activating MBON-11 can trigger boxing behavior in flies. To tackle this point, we examined the impact of MBON-11 activation on fly behavior in competitions within arenas, comparing territories filled with standard food and yeast against those containing non-nutritive agar. Our findings indicate that MBON-11 activation triggered boxing behaviors specifically in contexts involving meaningful competition, such as for territories enriched with food. Conversely, no boxing events were observed in territories containing only agar (Fig 2E). The nutritional composition of the territory did not affect the occurrence of boxing behaviors, as dyads engaged equally in boxing in territories containing agar mixed with either yeast or sucrose (Fig 2F). Together, the effects of MBON-11 activation are consistent with those observed following VPM4 activation, indicating a potential functional connection between VPM4 and MBON-11 in modulating high-intensity aggressive behavior.

Figure 2

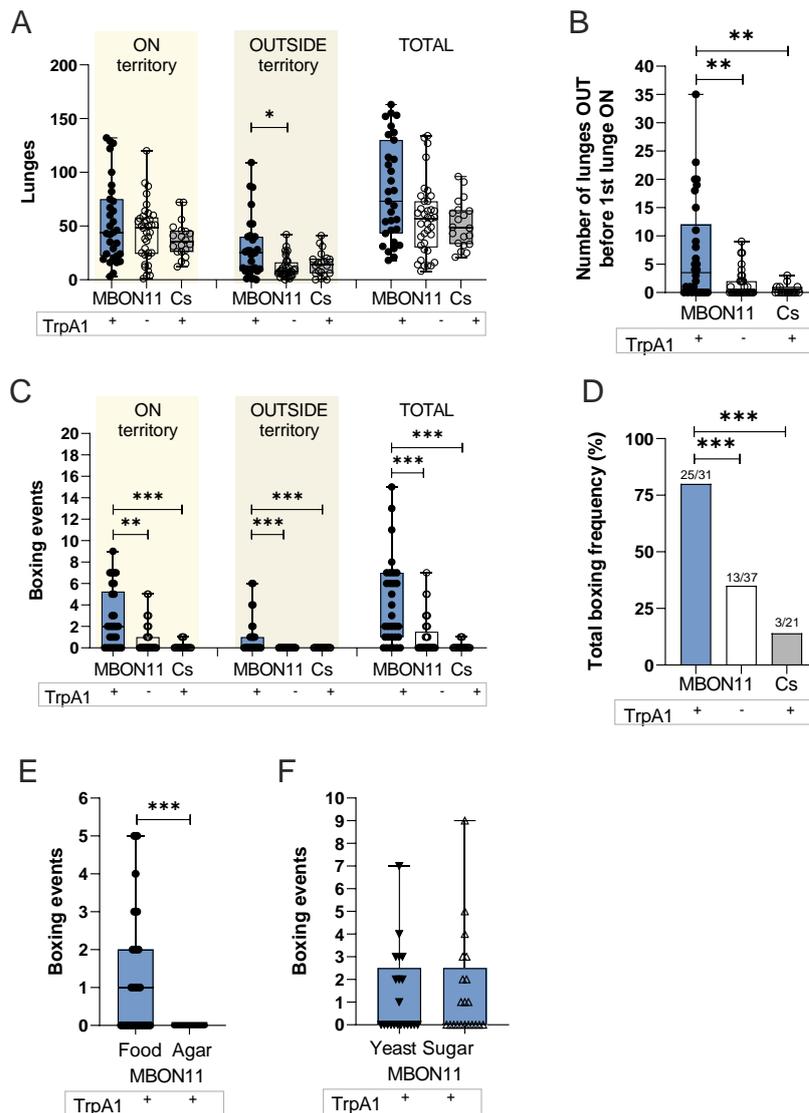


Figure 2: Conditionally increasing MBON-11 activity causes hyper-aggression in relevant competition context.

(A) The number of lunges performed on territory doesn't differ between genotypes (Kruskal-Wallis $H=1.913$, $p=0.384$). VPM4/dTrpA1 males gives more lunge than GAL4 controls outside territory (Kruskal-Wallis $H=9.119$ $p=0.010$, Dunn's test $p=0.008$). Overall, activating MBON-11 do not increase the total number of lunges despite nearly significant p-value ($H=6.604$ $p=0.037$, Dunn's test_{MBON-11/dTrpA1 & MBON-11/+} $p=0.076$ and Dunn's test_{MBON-11/dTrpA1 & +/dTrpA1} $p=0.093$). (B) Conditional activation of MBON-11 increases the number of lunges displayed outside the territory before the first lunge performed on territory (Kruskal-Wallis $H=14.89$, $p=0.0006$, Dunn's test with MBON-11/+ $p=0.009$ and with +/dTrpA1 $p=0.001$). (C) The number of boxing event is significantly increased on territory (Kruskal-Wallis $H=20.77$, $p<0.0001$, Dunn's tests with MBON-11/+ $p=0.002$ and +/dTrpA1 $p<0.0001$), outside territory (Kruskal-Wallis $H=24.70$ and $p<0.0001$, Dunn's test with MBON-11/+ $p<0.0001$ and with +/dTrpA1 $p=0.0003$). MBON-11 activation increases boxing events overall (Kruskal-Wallis $H=30.35$, $p<0.0001$, Dunn's test with MBON-11/+ and with +/dTrpA1 $p<0.0001$). (D) Boxing frequency is

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

significantly increased when activating MBON-11 synaptic activity (Analysis of deviance type II $\chi^2=27.169$, $Df=2$, $p<0.0001$; χ^2 post-test_{MBON-11/dTrpA1 & MBON-11/+} =14.89, $Df=1$, $p<0.001$; χ^2 post-test_{MBON-11/dTrpA1 & +/dTrpA1} =24.092, $Df=1$, $p<0.001$). (E) The increase of boxing event is only seen when the territory is filled with food (Mann-Whitney $U=110$, $p=0.0002$). (F) Nutritional value of the territory doesn't influence the number of boxing events (Mann-Whitney $U=213$, $p=0.842$).

Figure Supp 2

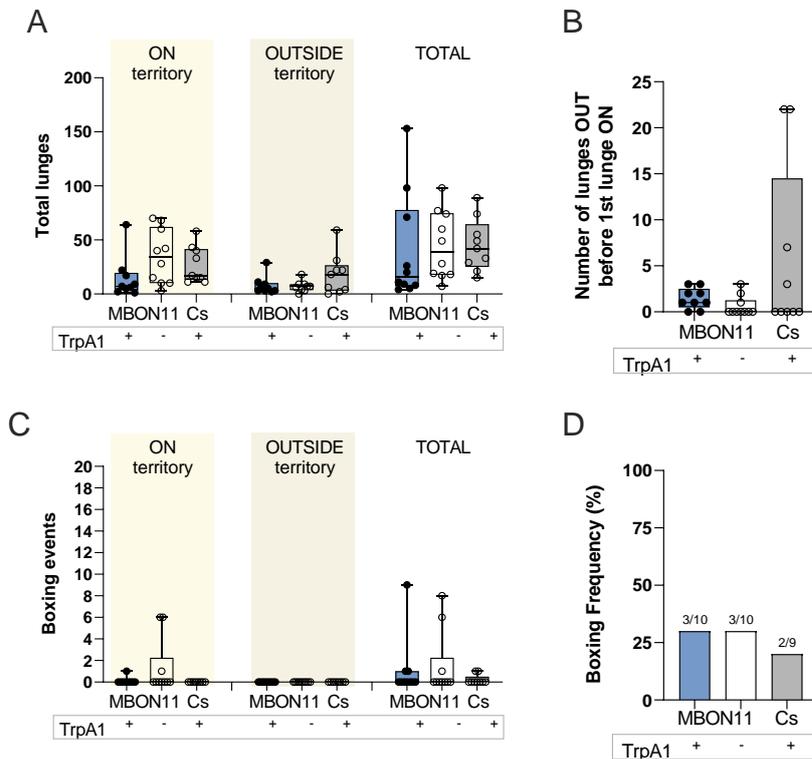


Figure Supp 2: No aggression phenotype is seen at non-permissive temperature.

(A) When performing experiments at low temperature, no differences in the number of lunges performed inside, outside the territory and overall is observed (Kruskal-Wallis, inside: $H=5.401$, $p=0.067$, outside: $H=1.376$, $p=0.503$ and overall: $H=1.939$, $p=0.379$). (B) The number of lunges displayed outside the territory before the first one on it, is not different (Kruskal-Wallis $H=2.881$ and $p=0.237$). (C) The numbers of boxing events on (Kruskal-Wallis $H=3.394$, $p=0.183$), outside (no boxing observed), and overall (Kruskal-Wallis $H=0.365$, $p=0.833$) are not different, neither is (D) the boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=0.193$, $Df=2$, $p=0.908$).

Figure Supp 3

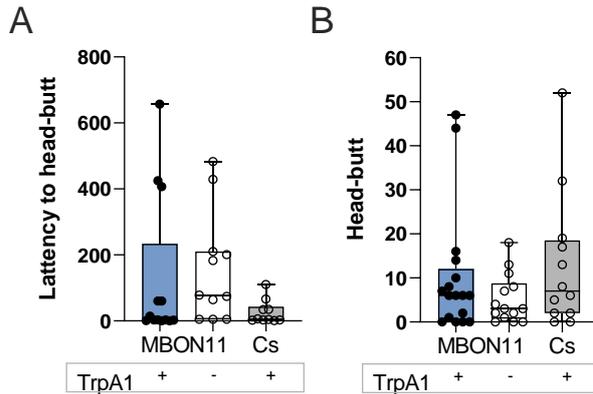


Figure Supp 3: Synaptic activation of MBON-11 doesn’t influence female aggression.

(A) The latency to head-butt and (B) the number of head-butt are not statistically different between groups (Kruskal-Wallis $H=6.6$ $p=0.037$; Dunn’s test both >0.05 ; Kruskal-Wallis $H=1.587$ $p=0.452$, respectively).

GABA accumulation within MBON-11 triggers high-intensity aggression

Our results revealed that enhanced synaptic activity from MBON-11 leads to a hyper-aggressive state in individuals. Given that MBON-11 use GABA as its neurotransmitter, we aimed to elevate the GABA levels within these cells and ask whether this could replicate the behavioral phenotype observed upon conditional activation of MBON-11. However, increasing the expression of GAD1 enzyme, responsible for synthesising GABA from glutamate, did not affect the number of lunges (Fig Supp 4A), the number of boxing events (Fig Supp 4B), nor the boxing frequency (Fig Supp 4C). We therefore employed an alternative strategy to increase the GABA pool, consisting of reducing the expression of the GABA-Transaminase (GABA-T), an enzyme essential for GABA degradation, in MBON-11. This downregulation of GABA-T led to an increase in the number of lunges (Fig 3A), boxing events (Fig 3B) and their frequency (Fig 3C) compared to both control groups. Together, our findings suggest that elevated GABA pool within MBON-11 neurons recapitulates what was observed by increasing synaptic activity of those neurons, and highlights the regulatory role of GABA in modulating hyper-aggressive state in male flies.

Figure 3

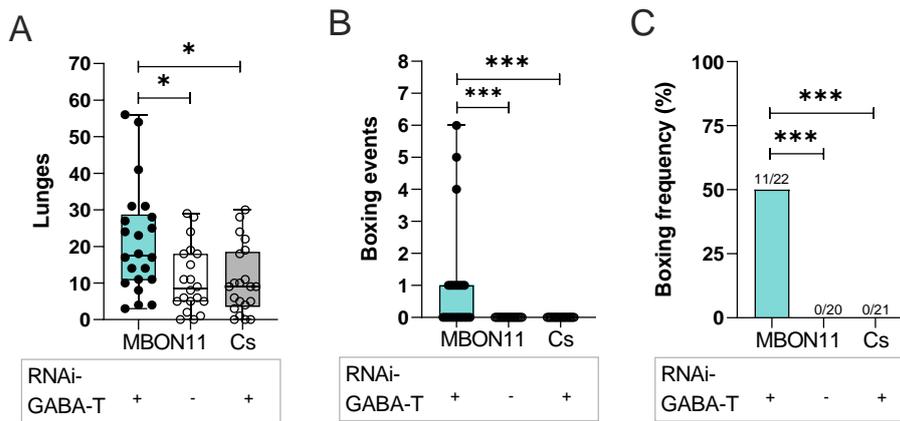


Figure 3: Inhibiting GABA degradation within MBON-11 leads to high-intensity male-male aggression.

(A) The downregulation of GABA-T within MBON-11 significantly increases the number of lunges compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=8.763$, $p=0.012$, Dunn's test $p=0.047$) and UAS controls (Dunn's test $p=0.023$), as well as (B) the number of boxing events that is increased compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=22.75$, $p<0.0001$, Dunn's test_{MBON-11/RNAi-GABA-T & MBON-11/+} $p=0.0001$; Dunn's test_{MBON-11/RNAi-GABA-T & +/RNAi-GABA-T} $p=0.0001$). (C) Boxing frequency is also significantly higher (Analysis of deviance type II $\chi^2=27.854$, $Df=2$, $p<0.0001$; χ^2 post-test_{MBON11/RNAi-GABA-T & MBON11/+} $=17.805$, $df=1$, $p<0.001$; χ^2 post-test_{MBON11/RNAi-GABA-T & +/RNAi-GABA-T} $=18.404$, $df=1$, $p<0.001$).

Figure Supp 4

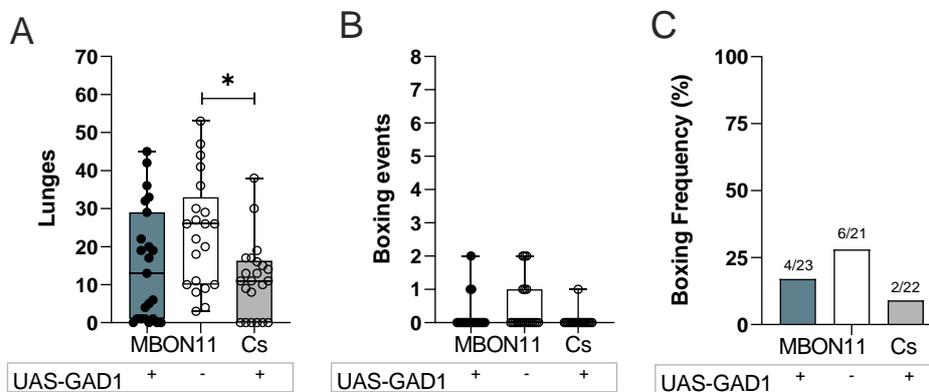


Figure Supp 4: Over-expression of GAD1 doesn't induce high-intensity male-male aggression.

(A) Increasing expression of GAD1 enzyme within MBON-11 doesn't impact the number of lunges. However, the GAL4 control group tend to display more lunges (Kruskal-Wallis $H=8.187$, $p=0.017$). (B) The number of boxing event is not increased (Kruskal-Wallis $H=4.807$, $p=0.09$), (C) nor the boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=2.80$, $Df=2$, $p=0.246$).

Inhibition of MBON-11 through glutamatergic GluCl α receptor is necessary to prevent boxing

To establish functional connection between VPM4 and MBON-11, we investigated whether MBON-11 receives glutamatergic inputs through glutamatergic receptors. Transcriptomic analysis by Aso et al. revealed that both NMDAR2 and GluCl α are expressed in MBON-11 (Aso et al. 2019). Our initial step was to verify the colocalization of MBON-11 with NMDAR2 expression (data not shown). Subsequently, we used RNAi to knock down NMDAR2, which is excitatory, and GluCl α , which is inhibitory, in MBON-11, and conducted male-male aggression assays to assess changes in aggression levels. Knockdown of NMDAR2 in MBON-11 did not lead to a decrease in aggression, as both the latency to lunge and the number of lunges remained unchanged (Fig 4A and B). Additional experiments involving RNAi against NMDAR1, and both NMDAR1 and NMDAR2, similarly did not demonstrate a reduction in aggression (Fig Supp 5). Conversely, reduction of GluCl α expression appeared to decrease the latency to lunge (Fig 4C), significantly increased the number of lunges (Fig 4D), the number of boxing events (Fig 4E), and the boxing frequency (Fig 4F).

Figure 4

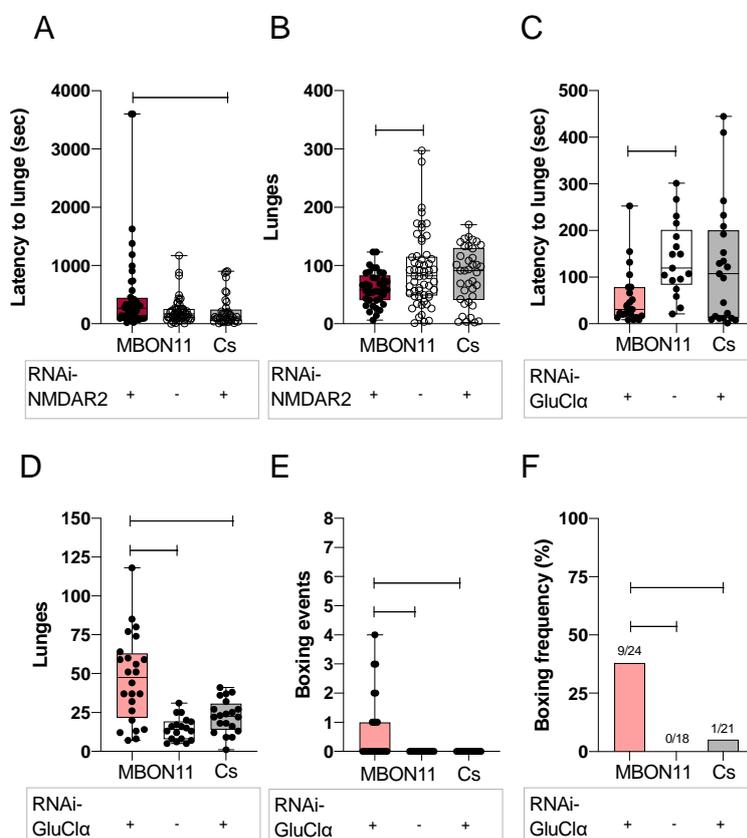


Figure 4: The glutamatergic GluCl α inhibitory receptor is necessary on MBON-11 to regulate aggressive behaviors.

(A) Colocalization between MBON-11 and NMDAR-2 immunostaining. (B) Downregulation of NMDAR-2 in MBON-11 increases the latency to lunge compared to UAS control (Kruskal-Wallis, $H=9.01$, $p=0.011$, Dunn's test $p=0.011$) but not to GAL4 control ($p=0.097$). (C) The number of lunges is reduced in MBON-11/RNAi-NMDAR-2 males compared to compared to GAL4 control (Kruskal-Wallis $H=7.005$, $p=0.030$, Dunn's test $p=0.041$), but not to UAS control ($p=0.091$). (D) Downregulating the expression of GluCl α in MBON-11 reduces latency to lunge compared to GAL4 control (Kruskal-Wallis $H=9.751$, $p=0.0076$, Dunn's test $p=0.0057$) but not to UAS control ($p=0.2843$). (E) The number of lunges is increased compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=19.72$, $p<0.0001$, Dunn's test $p<0.0001$) and UAS controls ($p=0.038$), as well as (F) the number of boxing events compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=16.28$, $p=0.0003$, Dunn's test $p=0.0022$) and UAS controls ($p=0.0015$). (G) The boxing frequency is significantly higher in MBON-11/RNAi-GluCl α males (Analysis of deviance type II $\chi^2=15.337$, $Df=2$, $p=0.0004$; $\chi^2_{\text{post-test}_{\text{MBON-11/RNAi-GluCl}\alpha \& \text{MBON11/+}}}=11.89$, $Df=1$, $p<0.001$; $\chi^2_{\text{post-test}_{\text{MBON-11/RNAi-GluCl}\alpha \& \text{+/RNAi-GluCl}\alpha}}=7.878$, $Df=1$, $p=0.005$).

Figure Supp 5

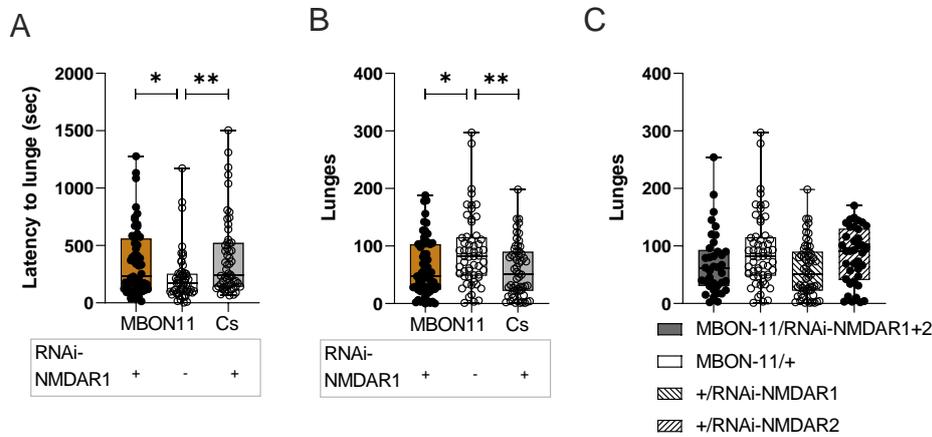


Figure Supp 5: NMDAR-1 downregulation and NMDAR-1/NMDAR-2 co-downregulation don't change aggressive behavior in flies.

(A) Downregulating expression of NMDAR-1 doesn't lead to changes in latency to lunge. However, this parameter is different for the GAL4 group (Kruskal-Wallis $H=12.24$, $p=0.002$, Dunn's test_{MBON-11 & MBON-11/RNAi-NMDAR1} $p=0.0276$ and Dunn's test_{MBON-11 & +/RNAi-NMDAR1} $p=0.0027$). (B) The number of lunges is also increased in the MBON-11/+ control males (Kruskal-Wallis $H=10.67$, $p=0.0048$, Dunn's test_{MBON-11 & MBON-11/RNAi-NMDAR1} $p=0.018$ and Dunn's test_{MBON-11 & +/RNAi-NMDAR1} $p=0.0098$). (C) Co-expressing RNAi against both NMDAR1 and NMDAR2 receptors in MBON-11 don't impact the number of lunges compared to controls (Kruskal-Wallis $H=11.82$, $p=0.008$).

Glutamate release specifically from VPM4 acts on MBON-11 to regulate individual’s hyper-aggressive state

Our findings established that glutamate release potentially from VPM4 inhibits MBON-11 via the inhibitory GluCl α receptor. However, connectomic data suggest that MBON-11 receives additional glutamatergic inputs from MBON-5. Given this, we explored whether increasing glutamate release from MBON-5 could similarly act on MBON-11 to regulate high-intensity aggression. To tackle this point, we expressed the UAS-dVGLUT transgene in MBON-5 using the MB298B-Split-Gal4 driver line (Aso et al, 2014). Our results indicated a trend toward a decreased latency to lunge (Fig 5A) and an increase in the number of lunges (Fig 5B). Although the number of boxing events did not increase among the experimental males (Fig 5C), the frequency of boxing was elevated compared to one of the control groups (Fig 5D). Together, our findings indicate that glutamate release from VPM4 is the main source of MBON-11 inhibition through GluCl α , thereby suppressing individual's hyper-aggressive state. In contrast, glutamate release from MBON-5 appears to exert a modest regulatory effect on MBON-11 in controlling aggression.

Figure 5

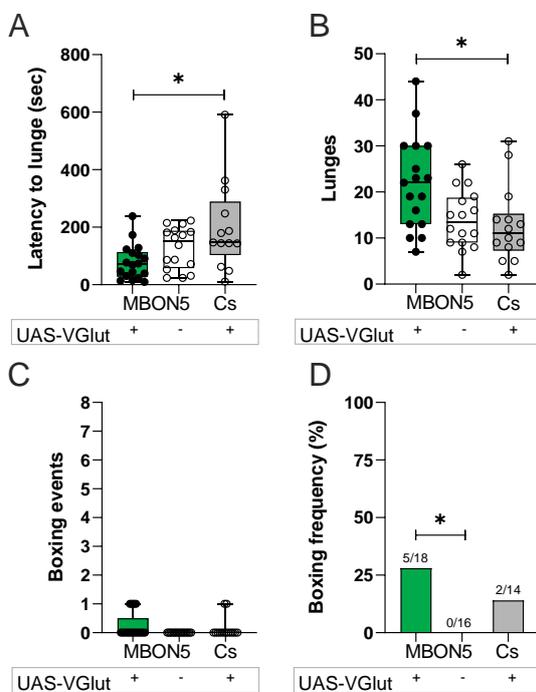


Figure 5: Enhanced glutamatergic release from MBON-5 does not induce hyper-aggression.

(A) Increasing glutamate release from MBON-5 reduced the latency to lunge compared to UAS control (Kruskal-Wallis $H=8.487$, $p=0.014$, Dunn's test $p=0.015$) but not to GAL4 control ($p=0.153$). (B) Similarly, the number of lunges is increased only compared to UAS control (Kruskal-Wallis $H=8.488$, $p=0.014$, Dunn's test $p=0.020$) but not to GAL4 control ($p=0.079$). (C) However, increasing glutamatergic release from MBON-5 doesn't trigger boxing events (Kruskal-Wallis $H=4.051$, $p=0.132$) (D) The boxing frequency is increased only compared to GAL4 control (Analysis of deviance type II $\chi^2=7.126$, $Df=2$, $p=0.0283$; χ^2 post-test_{MBON-5/UAS-VGut & MBON-5/+} =7.125, $Df=1$, $p=0.008^*$; χ^2 post-test_{MBON-5/UAS-VGut & +/- UAS-VGut} =0.867, $Df=1$, $p=0.352$; χ^2 post-test_{MBON-5/+ & +/- UAS-VGut} =3.213, $Df=1$, $p=0.073$).

Blocking GABA release from MBON-11 prevents hyper-aggressive state

We next asked whether GABA release from MBON-11 through VGAT, the vesicular GABA transporter, was crucial to regulate male-male aggression. For this purpose, we targeted expression of a RNAi against VGAT in MBON-11, and hypothesized that this manipulation would result in reduction of aggression levels. Under these experimental conditions, males did not exhibit any behavioral changes. The latency to lunge (Fig 6A), the number of lunges (Fig 6B), and the number of boxing events (Fig 6C) did not differ significantly from the control groups. Consistent with these observations, constitutive inhibition of MBON-11 using Kir2.1 also did not result in a decreased number of lunges (Fig 6D). These findings suggest that reducing synaptic activity or GABA release from MBON-11 is not necessary for regulating male-male aggression. However, reducing expression of VGAT while conditionally activating MBON-11 totally prevents flies to exhibit boxing behaviors (scoring on going). This suggests that release of GABA from MBON-11 when this later presents high activity, is required to induce dysregulated aggressive behaviors.

Figure 6

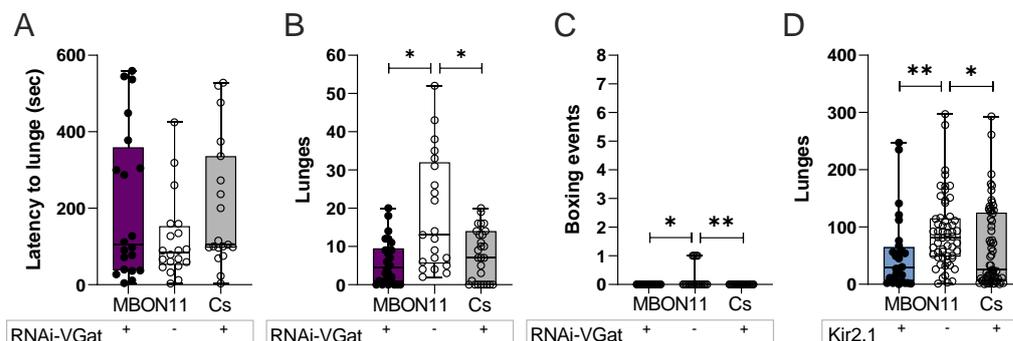


Figure 6: Release of GABA from MBON-11 is necessary to trigger hyper-aggressive

(A) Downregulating the expression of VGAT in MBON-11 doesn't impact the latency to lunge (Kruskal-Wallis $H=3.312$, $p=0.191$). (B) The number of lunges is not changed in experimental males. However, the GAL4 control males give significantly more lunges (Kruskal-Wallis $H=11.25$, $p=0.004$, Dunn's test_{MBON-11/+ & +/RNAi-VGAT} $p=0.039$; Dunn's test_{MBON-11/+ & MBON-11/RNAi-VGAT} $p=0.003$). (C) No boxing event is observed in MBON-11/RNAi-VGAT experimental males. However, GAL4 control give more lunge than both UAS control (Kruskal-Wallis

H=11.06, $p=0.004$, Dunn's test_{MBON-11/+ & +/RNAi-VGAT} $p=0.009$; Dunn's test_{MBON-11/+ & MBON-11/RNAi-VGAT} $p=0.01$). **(D)** Silencing MBON-11 neurotransmission with Kir2.1 doesn't change the number of lunges. However, this parameter is statistically higher in MBON-11/+ compared to both other groups (Kruskal-Wallis H=14.9, $p=0.0006$, Dunn's test_{MBON-11/+ & +/RNAi-VGAT} $p=0,0057$; Dunn's test_{MBON-11/+ & MBON-11/RNAi-VGAT} $p=0,0023$).

A negative feedback loop is essential to regulate MBON-11 activity and male-male aggression

MBON-11 is one of the few MBON reported to form auto-synapses, providing a potential negative feedback loop (Aso et al, 2014). To explore the role of this inhibitory feedback mechanism in regulating MBON-11 activity, and consequently the level of male-male aggression, we targeted expression of RNAi against the GABA receptors Rdl, GABAB-R1, GABAB-R2 and GABAB-R3, known to be expressed in MBON-11 (Aso et al, 2019). Knockdown of the Rdl receptor resulted in a decreased latency to lunge compared to control groups (Fig 7A), a slight increase in the number of lunges (Fig 7B), and a significant increase in the number of boxing events (Fig 7C). Additionally, 78% of the pairs (18 out of 23) exhibited boxing behavior (Fig 7D). Similarly, reduction of the GABAB-R3 receptor expression also led to increased and more frequent boxing (Fig 7E and F), though the effects were less pronounced than those observed with Rdl receptor manipulation. Together, these results highlight the importance of the MBON-11 inhibitory feedback loop in modulating synaptic activity of MBON-11, and consequently in regulating levels of male-male aggression.

Figure 7

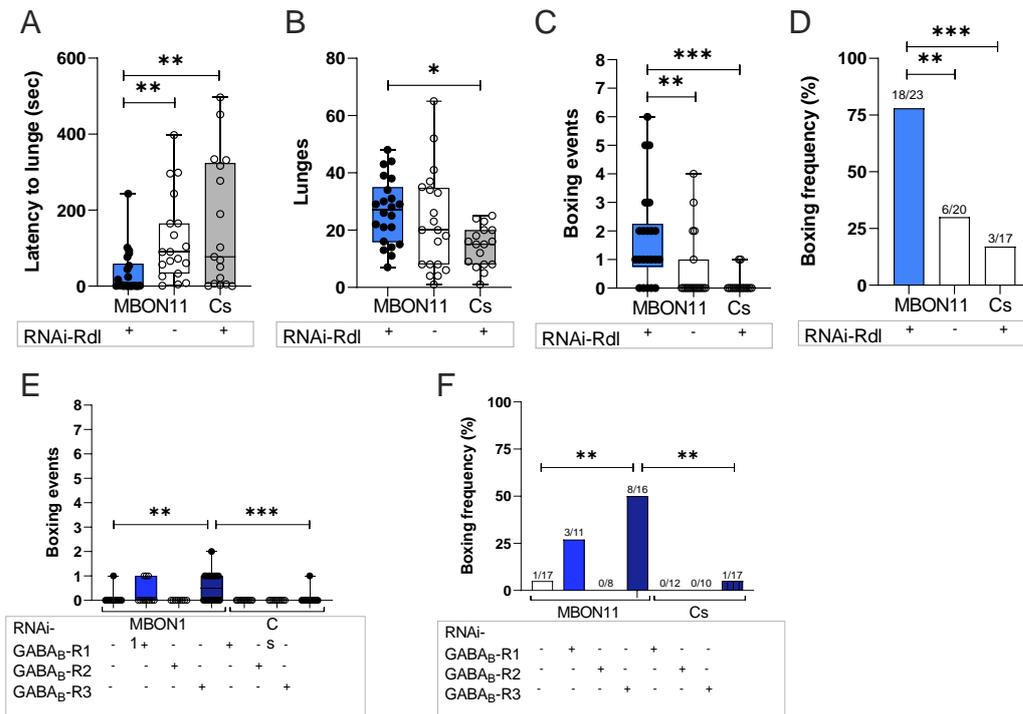


Figure 7: GABA receptors Rdl and GABA_B-R3 on MBON-11 are required to prevent boxing.

(A) Downregulating expression of Rdl receptor reduces the latency to lunge compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=13.96$, $p=0.0009$, Dunn's test $p=0.003$) and UAS controls ($p=0.007$). (B) The number of lunges is significantly increased compared to UAS control (Kruskal-Wallis $H=9.120$, $p=0.010$, Dunn's test $p=0.008$) but not to GAL4 one ($p=0.507$). (C) The number of boxing events is increased compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=17.95$, $p=0.001$, Dunn's test $p=0.007$) and UAS control groups ($p=0.0002$). (D) Boxing frequency is also significantly higher (Analysis of deviance type II $\chi^2=18.213$, $Df=2$, $p=0.0001$, χ^2 post-test_{MBON-11/RNAi-Rdl & MBON-11/+} =10.508, $Df=1$, $p=0.0012$; χ^2 post-test_{MBON-11/RNAi-Rdl & +/MBON-11/RNAi-Rdl} =15.423, $Df=1$, $p<0.001$). (E) In addition, downregulating expression of GABA_B-R3 in MBON-11 increases the number of boxing events compared to both GAL4 (Kruskal-Wallis $H=25.10$, $p=0.0003$, Dunn's test $p=0.006$) and UAS control groups ($p=0.006$), and (F) the boxing frequency (Analysis of deviance type II $\chi^2=24.357$, $Df=6$, $p=0.0004$; χ^2 post-test_{MBON-11/RNAi-GABA-R3 & MBON-11/+} =8.886, $df=1$, $p=0.003$; χ^2 post-test_{MBON-11/RNAi-GABA-R3 & +/MBON-11/RNAi-GABA-R3} =8.886, $df=1$, $p=0.003$).

Discussion

Understanding the emergence of intense aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster* remains a challenge, with our comprehension still evolving. In the present study, we have identified critical components involved in the regulation of aggression. Neuronal Components: i) VPM4 neurons: These neurons engage in dual neurotransmitter release. ii) MBON-11 neurons: These are the key target neurons modulated by VPM4 activity. Molecular mechanisms: i) GluCl α receptors on MBON-11: These receptors facilitate the binding of glutamate released from VPM4 neurons. ii) GABA-T and VGAT: These molecules are

involved in the GABAergic signaling within MBON-11 neurons. iii) Rdl and GABAB-R3 receptors: These receptors contribute to a negative feedback loop that modulates MBON-11 activity, crucial for maintaining appropriate aggressive behavior. Our findings illustrate that elevated activity in MBON-11 neurons disrupts normal male-male aggression. However, suppressing synaptic activity in MBON-11 or reducing GABA release from these neurons did not significantly alter aggressive behavior. Furthermore, our results highlight the role of dual co-transmission from VPM4 neurons and its implications in regulating the intensity of aggressive behaviors. This dual neurotransmission involves both glutamate and OA, suggesting a complex modulation mechanism. Overall, these insights offer a deeper understanding of the neuronal and molecular basis of aggression in *Drosophila*, revealing the intricate interplay between VPM4 and MBON-11 neurons in controlling aggressive responses.

Our initial hypothesis suggests that MBON-11 activity is specifically modulated by glutamate release from VPM4 neurons. However, MBON-11 receives glutamatergic inputs from both VPM4 and MBON-5 neurons. To disentangle these distinct glutamatergic contributions to the regulation of male-male aggression, we increased glutamatergic transmission from both sources. The results from VPM4 manipulation were straightforward, showing a clear increase of aggression. In contrast, increasing glutamate release from MBON-5 produced less definitive outcomes: boxing events were rare and usually not exceeding one event per arena and only slightly elevated boxing frequency of boxing behavior. These findings suggest that the glutamatergic regulation of MBON-11, particularly in the context of male-male aggression, is predominantly driven by VPM4-derived glutamate. The relatively minor impact of MBON-5 on aggression underscores the specificity of VPM4 in modulating MBON-11 activity and subsequent aggressive behaviors.

Recent studies have demonstrated that GluCl α receptors exhibit distinct expression patterns at the sub-cellular level, indicating a finely tuned spatial regulation of their localization within individual cells (Sanfilippo et al., 2024). Building on this, our next objective is to further elucidate the localization of GluCl α receptors specifically within MBON-11 neurons. Based on our findings, we hypothesize that GluCl α receptors will be predominantly localized in sub-cellular regions of MBON-11 that receive input from VPM4 neurons, as opposed to regions influenced by MBON-5 neurons. Additionally, mapping the precise localization of GluCl α receptors could reveal areas within MBON-11 that are not innervated by either VPM4 or MBON-5 neurons, yet expressing GluCl α . Identifying these sub-cellular regions may help

uncover other potential sources of synaptic input to MBON-11, providing deeper insights into the neural circuitry regulating aggression in *D. melanogaster*.

Applying a similar rationale to GABA receptors, we hypothesize that a significant source of GABAergic input to MBON-11 neurons originates from MBON-11 itself. Connectomic data reveal that MBON-11 is the second largest provider of GABAergic input to itself, with around 40 synaptic connections (Codex FlyWire; Buhmann et al., 2019; Dorckenwald et al., 2023; Heinrich et al., 2018; Schlegel et al., 2023). Given that increased activity in MBON-11 escalates aggression, this auto-inhibitory feedback loop could act as a crucial mechanism to modulate and contain aggressive behaviors in response to environmental demands. However, the primary source of GABAergic input to MBON-11 comes from the APL (anterior paired lateral) neurons, which establish approximately 100 synaptic connections with MBON-11. APL neurons are well-known for their roles in associative memory and reward evaluation (Mancini et al., 2023; Zhou et al., 2019), which are functions also attributed to MBON-11 (Perisse et al., 2016). The findings that winning fights are perceived as rewarding, whereas losing is perceived as aversive in flies (Kim et al., 2018), suggest that APL neurons could be involved in the regulation of aggression or the evaluation of fighting experiences. Investigating the role of APL neurons in these processes should be a focus of future studies. Moreover, identifying the specific GABA receptors that influence aggression is essential. To investigate the sub-cellular localization of Rdl and GABAB-R3 receptors within MBON-11 neurons, immunohistochemistry techniques could be used. This approach would enable detailed characterization of the negative feedback loop involved in modulating MBON-11 activity, providing insights into its role in the regulation of aggression.

Currently, the outputs of MBON-11 neurons have not been clearly elucidated. Interestingly, while APL neurons are the primary source of GABAergic input to MBON-11, they also serve as its major output, with an extensive range of approximately 260 to 500 connections (Codex flywire, Buhmann et al. 2019; Dorckenwald et al. 2023; Heinrich et al. 2018; Schlegel et al. 2023). This substantial feedback loop between MBON-11 and APL neurons warrants further investigation, especially given their established roles in appetitive memory. Among the known targets of MBON-11, there is the crepine region (Aso, Sitaraman, et al., 2014). Emerging evidence suggests that the crepine plays a role in movement and the reward system (Dvořáček & Kodrík, 2021; Sabandal et al., 2022). Further investigation into the crepine region could provide valuable insights into the neuronal populations and circuits involved in the execution

of aggression-related behaviors. This would help elucidate how MBON-11 influences both movement and motivational aspects of aggression.

Further studies will explore the exact nature of the cause of boxing behavior, particularly how the dysregulation of VPM4 and MBON-11 may ecologically happen. One plausible scenario is linked to starvation. Notably, VPM4 responds to food intake, while MBON-11 shows heightened activity during starvation in flies (Li et al., 2020; Perisse et al., 2016). Previous research has demonstrated that starvation elevates aggression in flies (Belenioti & Chaniotakis, 2020; Edmunds et al., 2021). Further investigation, including manipulation of MBON-11 activity during starvation, is warranted to ascertain whether starvation may induce increased aggression via modulation of MBON-11 activity. Another perspective would be to consider that boxing arise from a lack of inhibition A promising approach would involve evaluating the inhibition capabilities of flies based on MBON-11 activity using a Go-no go task, akin to the methodology employed by Sabandal et al. (Sabandal et al., 2022). Another plausible explanation for heightened aggression could stem from the perceived value of the contested resource. Dysregulated activity of MBON-11 might skew the balance between potential benefits and risks in favor of a highly valued expected reward. Consequently, the decision to engage in boxing behavior could be driven by the desire to acquire a resource perceived as highly rewarding. To test this hypothesis, a protocol akin to that described by Lim et al. (Lim et al., 2014). could be employed. Their findings demonstrated a positive correlation between food concentration in a territory and the intensity of aggression. In our study, we observed that a relevant competition context (territory with food) triggered boxing, while an irrelevant one (territory with agar) barely induced fighting. If MBON-11 activity alters the perception of reward value, we would anticipate higher aggression in MBON-11/dTRPA1 genotypes in conditions with lower food concentrations, without a proportional increase with higher concentrations due to a potential ceiling effect. An alternative method to investigate the benefits-risk balance independently of aggression could involve a gap-crossing test similar to that utilized in Kim et al.'s research (Kim et al., 2018) where activation of MBON-11 might lead to an increase in the number of gap crossings.

Yet, the boxing behavior observed in our experiments cannot be categorized strictly as violence. According to the criteria set by Natarajan and Caramaschi, violence is defined as behavior that is out of control, out of content, and out of context. The criterion of being out of control is largely met due to the significant escalation of fights during boxing. Similarly, boxing

does not align with the typical ritualized aggression patterns observed in *D.mel*, satisfying the criterion of being out of context. However, we cannot assert that observed boxing occurred out of context. While we question whether boxing for food constitutes a relevant context that is appropriate and adaptive, our experiments showed that when flies were placed in competition over a completely irrelevant territory composed of agar, they did not escalate fights to boxing and exhibited minimal lunging behavior. Based on these observations, rather than describing a circuit that fully induces actual violence, we propose to characterize a circuit underlying hyper-aggressiveness to some extent. Identifying what is lacking in this circuit to trigger aggression that meets all three criteria of violence would be essential to comprehensively understanding the circuitry of aggression.

Furthermore, boxing represents a distinct behavior among various forms of aggression. Unlike other types, boxing requires simultaneous engagement from both males, where each lunges at the other simultaneously. In future investigations, boxing could be considered as a defensive behaviour, triggered in response to aggression from the other male (de Boer, 2016). Previous study showed that previous fight experience are crucial to perform correct opponent and self-assessment (Camerlink et al., 2017). In our study, flies were socially isolated, a condition known to heighten aggression (Agrawal et al., 2020) and preclude opportunities for fighting skill development. To address whether assessment skills are essential, an approach could involve inducing fights between asymmetrical opponents (e.g., heavier fly versus lighter fly, resident versus intruder). Body weight and status significantly influence fight outcomes favoring the resident or heavier fly (Hoffmann, 1987). If MBON-11 activation impairs assessment skills, boxing might occur when a lighter fly with activated neurons confronts a naive heavier fly, but not when the neurons of a heavier fly are activated against a lighter opponent. This experiment could also clarify whether boxing is a reactive or proactive behavior.

In our model, hyper-aggressive state arises from increasing both VPM4 and MBON-11 activity. However, if VPM4 activity regulates MBON-11 via inhibitory GluCl α receptors, activating VPM4 with dTRPA1 would likely result in no aggression. Three hypotheses could potentially explain such behavioral observation. The first hypothesis proposes desensitization of GluCl α receptors due to continuous glutamate presence in the synapse resulting from sustained activation of VPM4 by dTRPA1. Desensitization phenomena have been observed in GluCl- α 2 receptors (Pemberton et al., 2001) as well as other ionotropic glutamate receptors like AMPAR and NMDAR (Aittoniemi et al., 2023; Danbolt, 2001; Sibarov & Antonov, 2018).

The second hypothesis revolves around NMDAR2 expression on MBON-11. Persistent activation of VPM4 may saturate the synaptic cleft with glutamate, leading to saturation of post-synaptic glutamate receptors. Consequently, both NMDAR and GluCl α receptors could be activated, with NMDAR potentially overriding the input of GluCl α , resulting in abnormal activation of MBON-11 instead of inhibition. A third mechanism might also be implicated subsequent to one or both of these hypotheses. With such deregulated activation, the feedback loop of MBON-11, primarily involving Rdl and GABAB-R3 receptors, could be impaired. Desensitization can also affect GABA receptors (Field et al., 2021; Gielen et al., 2015). These hypotheses are not exclusives.

Conclusion

As a conclusion, our study demonstrated the importance of dual-transmission OA/GLU in one population of neuron: the VPM4. In particular, GLU seems to assure specific functional role that is not supported by OA in the VPM4 such as the escalation of aggression. We highlighted the functional glutamatergic inhibitory connection between VPM4 and MBON-11 through GluCl α as key in the regulation of fight escalation. MBON-11 activity in particular need to be regulated by both GLU and GABA inhibitory inputs. We hypothesized that MBON-11 negative feedback loop could be another key process in MBON-11 activity regulation, but further studies are required to draw a conclusion. Taken together, our study is a new evidence to consider dual-transmission process as a new way to regulate aggression, and may allow a new point of view regarding how neurons actually regulate aggression.

References

- Agrawal, P., Damian, K., Phuong, C., & Loren, L. L. (2020). The neuropeptide Drosulfakinin regulates social isolation-induced aggression in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 223(5), 549–563. <https://doi.org/10.1037/bne0000089>
- Aittoniemi, J., Jensen, M. Ø., Pan, A. C., & Shaw, D. E. (2023). Desensitization dynamics of the AMPA receptor. *Structure*, 31(6), 724–734.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2023.03.013>
- Alekseyenko, O. V., Chan, Y.-B., Fernandez, M. de la P., Bülow, T., Pankratz, M. J., & Kravitz, E. A. (2014). Single Serotonergic Neurons that Modulate Aggression in *Drosophila*. *Current Biology*, 24(22), 2700–2707. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.051>
- Alekseyenko, O. V., Chan, Y.-B., Li, R., & Kravitz, E. A. (2013). Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 6151–6156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303446110>
- Andrews, J. C., Fernández, M. P., Yu, Q., Leary, G. P., Leung, A. K. W., Kavanaugh, M. P., Kravitz, E. A., & Certel, S. J. (2014). Octopamine Neuromodulation Regulates Gr32a-Linked Aggression and Courtship Pathways in *Drosophila* Males. *PLoS Genetics*, 10(5), e1004356. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004356>
- Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2012). Genetics of Aggression. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 145–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155514>
- Asahina, K. (2017). Neuromodulation and Strategic Action Choice in *Drosophila* Aggression. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 51–75. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031240>
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T.-T., Dionne, H., Abbott, L., Axel, R., Tanimoto, H., & Rubin, G. M. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, 3, e04577. <https://doi.org/10.7554/eLife.04577>
- Aso, Y., Ray, R. P., Long, X., Bushey, D., Cichewicz, K., Ngo, T.-T., Sharp, B., Christoforou, C., Hu, A., Lemire, A. L., Tillberg, P., Hirsh, J., Litwin-Kumar, A., & Rubin, G. M. (2019). Nitric oxide acts as a cotransmitter in a subset of dopaminergic neurons to diversify memory dynamics. *eLife*, 8, e49257. <https://doi.org/10.7554/eLife.49257>
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K. R., Vogt, K., Belliard-Guérin, G., Plaçais, P.-Y., Robie, A. A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., Rowell, W. J., Johnston, R. M., Ngo, T.-T. B., Chen, N., Korff, W., Nitabach, M. N., Heberlein, U., Preat, T., Branson, K. M., ... Rubin, G. M. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife*, 3, e04580. <https://doi.org/10.7554/eLife.04580>
- Bartholow, B. D. (2018). The aggressive brain: Insights from neuroscience. *Current Opinion in Psychology*, 19, 60–64. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.002>
- Beilharz, R. G., & Beilharz, V. C. (1975). Observations on Fighting Behaviour of Male Mice (*Mus musculus* L.). *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, 39(1–5), 126–140. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1975.tb00903.x>
- Belenioti, M., & Chaniotakis, N. (2020). Aggressive Behaviour of *Drosophila* *suzukii* in Relation to Environmental and Social Factors. *Scientific Reports*, 10(1), 7898. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64941-1>
- Bergan, J. F. (2015). Neural Computation and Neuromodulation Underlying Social Behavior. *Integrative and Comparative Biology*, 55(2), 268–280. <https://doi.org/10.1093/icb/icv061>
- Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress: Effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, 73(3), 261–271. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8)
- Buhmann, J., Sheridan, A., Gerhard, S., Krause, R., Nguyen, T., Heinrich, L., Schlegel, P., Lee, W.-C. A., Wilson, R., Saalfeld, S., Jefferis, G., Bock, D., Turaga, S., Cook, M., & Funke, J. (2019). Automatic Detection of Synaptic Partners in a Whole-Brain *Drosophila* EM Dataset. <https://doi.org/10.1101/2019.12.12.874172>

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

- Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., & Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature*, 492(7429), 433–437. <https://doi.org/10.1038/nature11614>
- Busch, S., Selcho, M., Ito, K., & Tanimoto, H. (2009). A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(6), 643–667. <https://doi.org/10.1002/cne.21966>
- Camerlink, I., Turner, S. P., Farish, M., & Arnott, G. (2017). The influence of experience on contest assessment strategies. *Scientific Reports*, 7(1), 14492. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15144-8>
- Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R., & Kravitz, E. A. (2002). Fighting fruit flies: A model system for the study of aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5664–5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.082102599>
- Chowdhury, B., Chan, Y.-B., & Kravitz, E. A. (2017). Putative transmembrane transporter modulates higher-level aggression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(9), 2373–2378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618354114>
- Chowdhury, B., Wang, M., Gnerer, J. P., & Dierick, H. A. (2021). The Divider Assay is a high-throughput pipeline for aggression analysis in *Drosophila*. *Communications Biology*, 4(1), 85. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01617-6>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, 65(1), 1–105. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8)
- De Almeida, R. M. M., Ferrari, P. F., Parmigiani, S., & Miczek, K. A. (2005). Escalated aggressive behavior: Dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*, 526(1–3), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.10.004>
- de Boer, S. F. (2016). *Untangling the neurobiology of escalated aggression in animals*. 57–72. <http://www.csf2016.com/index.php>
- De Boer, S. F. (2018). Animal models of excessive aggression: Implications for human aggression and violence. *Current Opinion in Psychology*, 19, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.006>
- Dierick, H. A., & Greenspan, R. J. (2006). Molecular analysis of flies selected for aggressive behavior. *Nature Genetics*, 38(9), 1023–1031. <https://doi.org/10.1038/ng1864>
- Dorkenwald, S., Matsliah, A., Sterling, A. R., Schlegel, P., Yu, S., McKellar, C. E., Lin, A., Costa, M., Eichler, K., Yin, Y., Silversmith, W., Schneider-Mizell, C., Jordan, C. S., Brittain, D., Halageri, A., Kuehner, K., Ogedengbe, O., Morey, R., Gager, J., ... the FlyWire Consortium. (2023). *Neuronal wiring diagram of an adult brain*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546656>
- Dow, M. A., & Schilcher, F. V. (1975). Aggression and mating success in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 254(5500), 511–512. <https://doi.org/10.1038/254511a0>
- Edmunds, D., Wigby, S., & Perry, J. C. (2021). ‘Hangry’ *Drosophila*: Food deprivation increases male aggression. *Animal Behaviour*, 177, 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.05.001>
- Edwards, R. H. (2007). The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron*, 55(6), 835–858. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.001>
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G. M., Descarries, L., & Trudeau, L.-E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: Vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 204–216. <https://doi.org/10.1038/nrn2969>
- Ferrari, P. F., Van Erp, A. M. M., Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (2003). Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 371–378. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02447.x>
- Field, M., Dorovykh, V., Thomas, P., & Smart, T. G. (2021). Physiological role for GABAA receptor desensitization in the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses. *Nature Communications*, 12(1), 2112. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22420-9>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression* [Computer software]. Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS : a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Gielen, M., Thomas, P., & Smart, T. G. (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nature Communications*, 6(1), 6829. <https://doi.org/10.1038/ncomms7829>
- Halász, J., Tóth, M., Kalló, I., Liposits, Z., & Haller, J. (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression—A double labeling study. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.019>
- Heinrich, L., Funke, J., Pape, C., Nunez-Iglesias, J., & Saalfeld, S. (2018). *Synaptic Cleft Segmentation in Non-Isotropic Volume Electron Microscopy of the Complete Drosophila Brain* (arXiv:1805.02718). arXiv. <http://arxiv.org/abs/1805.02718>
- Hoffmann, A. A. (1987). A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Animal Behaviour*, 35(3), 807–818. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(87\)80117-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80117-3)
- Hoffmann, A. A. (1990). The influence of age and experience with conspecifics on territorial behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Behavior*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/BF01049191>
- Hoyer, S. C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S. A., Hardie, S. L., & Heisenberg, M. (2008). Octopamine in Male Aggression of *Drosophila*. *Current Biology*, 18(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.052>
- Kabra, M., Robie, A. A., Rivera-Alba, M., Branson, S., & Branson, K. (2013). JAABA: Interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nature Methods*, 10(1), 64–67. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2281>
- Kawanabe, S., Mori, M., Harada, H., Murata, Y., Ohe, K., & Enjoji, M. (2023). Upregulations of $\alpha 1$ adrenergic receptors and noradrenaline synthases in the medial prefrontal cortex are associated with emotional and cognitive dysregulation induced by post-weaning social isolation in male rats. *Neuroscience Letters*, 797, 137071. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137071>
- Kim, Y.-K., Saver, M., Simon, J., Kent, C. F., Shao, L., Eddison, M., Agrawal, P., Texada, M., Truman, J. W., & Heberlein, U. (2018). Repetitive aggressive encounters generate a long-lasting internal state in *Drosophila melanogaster* males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(5), 1099–1104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716612115>
- König, C., Khalili, A., Niewalda, T., Gao, S., & Gerber, B. (2019). An optogenetic analogue of second-order reinforcement in *Drosophila*. *Biology Letters*, 15(7), 20190084. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0084>
- Li, F., Lindsey, J. W., Marin, E. C., Otto, N., Dreher, M., Dempsey, G., Stark, I., Bates, A. S., Pleijzier, M. W., Schlegel, P., Nern, A., Takemura, S., Eckstein, N., Yang, T., Francis, A., Braun, A., Parekh, R., Costa, M., Scheffer, L. K., ... Rubin, G. M. (2020). The connectome of the adult *Drosophila* mushroom body provides insights into function. *eLife*, 9, e62576. <https://doi.org/10.7554/eLife.62576>
- Lim, R. S., Eyjólfsson, E., Shin, E., Perona, P., & Anderson, D. J. (2014). How Food Controls Aggression in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 9(8), e105626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105626>
- Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., & Costa, E. (2005). Social isolation stress-induced aggression in mice: A model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*, 8(2), 85–93. <https://doi.org/10.1080/10253890500159022>
- Miczek, K. A., De Almeida, R. M. M., Kravitz, E. A., Rissman, E. F., De Boer, S. F., & Raine, A. (2007). Neurobiology of Escalated Aggression and Violence. *The Journal of Neuroscience*, 27(44), 11803–11806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3500-07.2007>
- Natarajan, D., & Caramaschi, D. (2010). Animal violence demystified. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00009>
- Parise, L. F., Joseph Burnett, C., & Russo, S. J. (2023). Early life stress and altered social behaviors: A perspective across species. *Neuroscience Research*, S0168010223002006. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.11.005>

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

- Patki, G., Atrooz, F., Alkadhi, I., Solanki, N., & Salim, S. (2015). High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. *Neuroscience Letters*, *584*, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.051>
- Pavlovsky, A., Schor, J., Plaçais, P.-Y., & Preat, T. (2018). A GABAergic Feedback Shapes Dopaminergic Input on the *Drosophila* Mushroom Body to Promote Appetitive Long-Term Memory. *Current Biology*, *28*(11), 1783–1793.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.040>
- Pemberton, D. J., Franks, C. J., Walker, R. J., & Holden-Dye, L. (2001). Characterization of Glutamate-Gated Chloride Channels in the Pharynx of Wild-Type and Mutant *Caenorhabditis elegans* Delineates the Role of the Subunit GluCl- α 2 in the Function of the Native Receptor. *Molecular Pharmacology*, *59*(5), 1037–1043. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1037>
- Perisse, E., Oswald, D., Barnstedt, O., Talbot, C. B., Huetteroth, W., & Waddell, S. (2016). Aversive Learning and Appetitive Motivation Toggle Feed-Forward Inhibition in the *Drosophila* Mushroom Body. *Neuron*, *90*(5), 1086–1099. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.034>
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Sabandal, P. R., Saldes, E. B., & Han, K.-A. (2022). Acetylcholine deficit causes dysfunctional inhibitory control in an aging-dependent manner. *Scientific Reports*, *12*(1), 20903. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25402-z>
- Sanfilippo, P., Kim, A. J., Bhukel, A., Yoo, J., Mirshahidi, P. S., Pandey, V., Bevir, H., Yuen, A., Mirshahidi, P. S., Guo, P., Li, H.-S., Wohlschlegel, J. A., Aso, Y., & Zipursky, S. L. (2024). Mapping of multiple neurotransmitter receptor subtypes and distinct protein complexes to the connectome. *Neuron*, *112*(6), 942–958.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.12.014>
- Sayin, S., De Backer, J.-F., Siju, K. P., Wosniack, M. E., Lewis, L. P., Frisch, L.-M., Gansen, B., Schlegel, P., Edmondson-Stait, A., Sharifi, N., Fisher, C. B., Calle-Schuler, S. A., Lauritzen, J. S., Bock, D. D., Costa, M., Jefferis, G. S. X. E., Gjorgjieva, J., & Grunwald Kadow, I. C. (2019). A Neural Circuit Arbitrates between Persistence and Withdrawal in Hungry *Drosophila*. *Neuron*, *104*(3), 544–558.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.028>
- Schlegel, P., Yin, Y., Bates, A. S., Dorkenwald, S., Eichler, K., Brooks, P., Han, D. S., Gkantia, M., Dos Santos, M., Munnelly, E. J., Badalamente, G., Capdevila, L. S., Sane, V. A., Pleijzier, M. W., Tamimi, I. F. M., Dunne, C. R., Salgarella, I., Javier, A., Fang, S., ... Jefferis, G. S. X. E. (2023). *Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing quantifies circuit stereotypy in Drosophila*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546055>
- Sengupta, S., Chan, Y.-B., Palavicino-Maggio, C. B., & Kravitz, E. A. (2022). GABA transmission from mAL interneurons regulates aggression in *Drosophila* males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *119*(5), e2117101119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117101119>
- Sherer, L. M., Catudio Garrett, E., Morgan, H. R., Brewer, E. D., Sirrs, L. A., Shearin, H. K., Williams, J. L., McCabe, B. D., Stowers, R. S., & Certel, S. J. (2020). Octopamine neuron dependent aggression requires dVGLUT from dual-transmitting neurons. *PLOS Genetics*, *16*(2), e1008609. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008609>
- Sibarov, D. A., & Antonov, S. M. (2018). Calcium-Dependent Desensitization of NMDA Receptors. *Biochimica Biophysica Acta*, *183*(10), 1173–1183. <https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
- Smith, J. M., & Price, G. R. (1973). *The logic of Animal Conflict*. 246, 4.
- Sturtevant, A. H. (1915). *Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in Drosophila*.
- Takahashi, A. (2022). Social Stress and Aggression in Murine Models. In K. A. Miczek & R. Sinha (Eds.), *Neuroscience of Social Stress* (pp. 181–208). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/7854_2021_243
- Takahashi, A., Lee, R. X., Iwasato, T., Itohara, S., Arima, H., Bettler, B., Miczek, K. A., & Koide, T. (2015). Glutamate Input in the Dorsal Raphe Nucleus As a Determinant of Escalated Aggression in Male Mice. *The Journal of Neuroscience*, *35*(16), 6452–6463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2450-14.2015>
- Takahashi, A., Quadros, I. M., De Almeida, R. M. M., & Miczek, K. A. (2011). Behavioral and Pharmacogenetics of Aggressive Behavior. In J. F. Cryan & A. Reif (Eds.), *Behavioral Neurogenetics* (Vol. 12, pp. 73–138). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7854_2011_191

RESULTATS – Mécanismes neuronaux de la régulation de l'agressivité

Trannoy, S., Fernandez, M. P., & Certel, S. J. (2023). Comparing Methods for Quantifying and Analyzing *Drosophila* Aggression. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2023(9), pdb.prot108144. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot108144>

Xiong, Y., Hong, H., Liu, C., & Zhang, Y. Q. (2023). Social isolation and the brain: Effects and mechanisms. *Molecular Psychiatry*, 28(1), 191–201. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01835-w>

Yadav, R., Gupta, S. C., Hillman, B. G., Bhatt, J. M., Stairs, D. J., & Dravid, S. M. (2012). Deletion of Glutamate Delta-1 Receptor in Mouse Leads to Aberrant Emotional and Social Behaviors. *PLoS ONE*, 7(3), e32969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032969>

Yamamoto, D., & Koganezawa, M. (2013). Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(10), 681–692. <https://doi.org/10.1038/nrn3567>

Youn, H., Kirkhart, C., Chia, J., & Scott, K. (2018). A subset of octopaminergic neurons that promotes feeding initiation in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 13(6), e0198362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198362>

Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A. C., & Kravitz, E. A. (2006). Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17519–17524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608211103>

Zheng, Z., Lauritzen, J. S., Perlman, E., Robinson, C. G., Nichols, M., Milkie, D., Torrens, O., Price, J., Fisher, C. B., Sharifi, N., Calle-Schuler, S. A., Kmecova, L., Ali, I. J., Karsh, B., Trautman, E. T., Bogovic, J. A., Hanslovsky, P., Jefferis, G. S. X. E., Kazhdan, M., ... Bock, D. D. (2018). A Complete Electron Microscopy Volume of the Brain of Adult *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 174(3), 730-743.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.019>

Zhou, C., Rao, Y., & Rao, Y. (2008). A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nature Neuroscience*, 11(9), 1059–1067. <https://doi.org/10.1038/nn.2164>

Acknowledgements

We would like to thank Anthony Defert (CRCA, Toulouse, France) who helped us with the statistical analysis, and thank the Edward Kravitz laboratory at Harvard Medical School (HMS, Boston, USA) for collecting preliminary results. We would also like to thank students trainees who helped us for data collection and analysis Yasmine Kraghel and Kamila Kahalerras

Authors contributions

Conceptualization: Severine Trannoy & Sarah Certel.

Data curation: Antoine Prunier, Lewis Sherer, Mariana Da Silva, Léa Bihl, Sarah Certel & Severine Trannoy.

Formal analysis: Antoine Prunier, Lewis Sherer, Mariana Da Silva, Léa Bihl, Sarah Certel & Severine Trannoy.

Funding acquisition: Severine Trannoy & Sarah Certel.

Project administration: Severine Trannoy.

Supervision: Severine Trannoy & Sarah Certel.

Writing – original draft: Antoine Prunier, Sarah Certel & Séverine Trannoy.

Writing – review & editing: Severine Trannoy & Sarah Certel.

2.3. Discussion

Dans ce chapitre, nous avons entrepris l'identification des mécanismes neuronaux et moléculaires impliqués dans la dérégulation des comportements agressifs de la drosophile. Nous avons pour cela concentré notre attention sur les neurones VPM4 en tant que neurones présentant la particularité de la double transmission OA-GLU, et sur les MBON-11 en tant que l'une des principales sorties des VPM4.

Tout d'abord, nous avons montré qu'augmenter le relargage du GLU des VPM4 augmentait le nombre de phénomènes de boxes observés. Notre étude, l'augmentation du relargage de l'OA, quant à elle, n'induisait aucune conséquence sur ces comportements. Nous avons ensuite montré que l'activation conditionnelle des neurones VPM4 et MBON-11 engendrent le même effet sur les comportements agressifs : les drosophiles montrent davantage de phénomènes de boxes pendant que le nombre de *lunges* tend à augmenter mais n'est pas statistiquement différent des contrôles génétiques. Cette similitude dans les phénotypes observés nous a poussé à étudier le lien fonctionnel existant entre les VPM4 et les MBON-11 au travers de récepteurs glutamatergique. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la sous-expression du canal chlorure glutamate-dépendant inhibiteur $\text{GluCl}\alpha$ sur le MBON-11 augmentait à la fois le nombre de phénomènes de boxe, mais également le nombre de *lunges*.

A ce stade, nous avons pu élaborer un modèle de régulation des comportements agressifs basé sur les résultats présentés ci-dessus (**Fig. 15**) : les neurones VPM4 relarguent à la fois de l'octopamine et du glutamate, mais seul ce dernier dérégule l'agressivité des mâles. Le glutamate relargué par le VPM4 va se fixer sur le récepteur $\text{GluCl}\alpha$ situé à la surface des neurones MBON-11. $\text{GluCl}\alpha$ un rôle inhibiteur, cette fixation va entraîner une inhibition des MBON-11, maintenant son activité neuronale à un niveau basal. Ce niveau d'activité basal est nécessaire pour les drosophiles pour leur permettre d'adopter une agressivité d'intensité normale et pour éviter l'escalade du combat en phénomène de boxe.

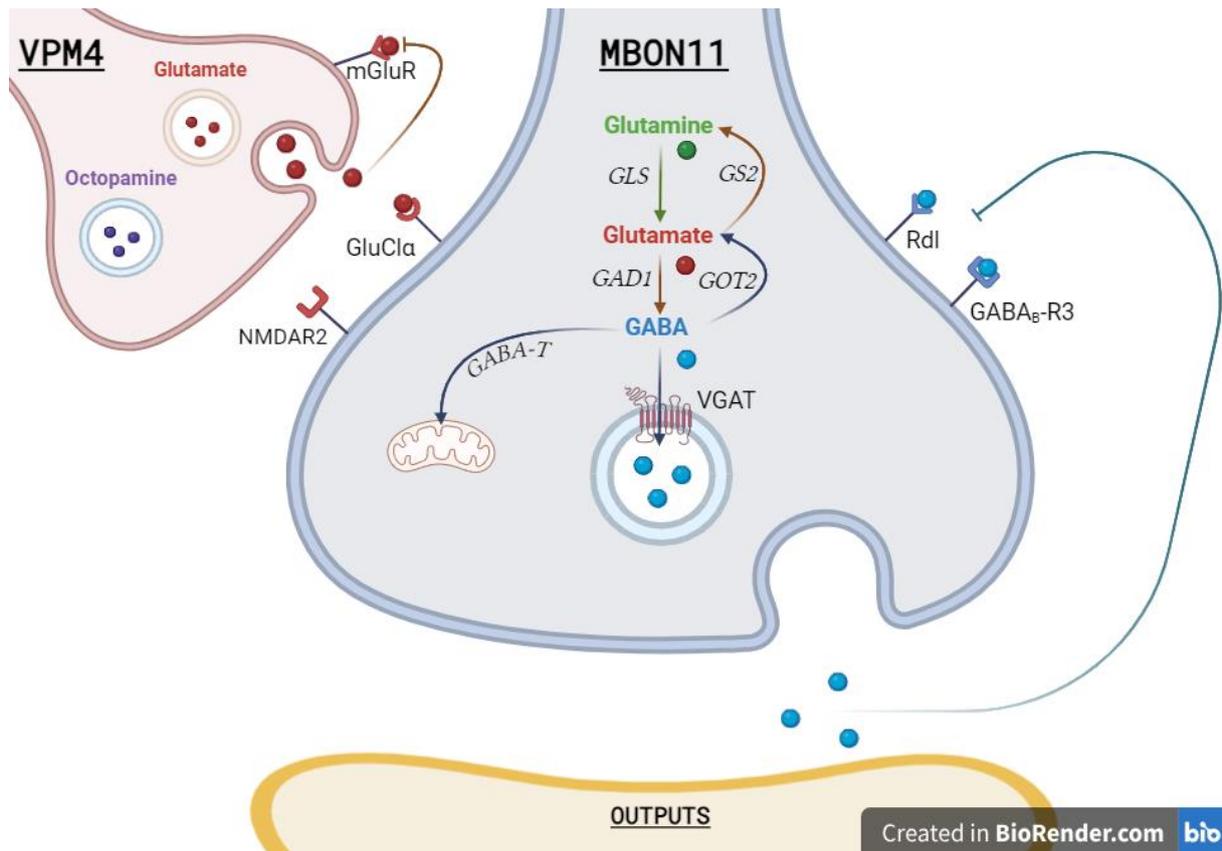


Figure 15 : Modèle des connexions VPM4/MBON-11 régulant l'agressivité

Le VPM4 relargue de l'octopamine (OA) et du glutamate (GLU) dans la fente synaptique le connectant au MBON-11. Seul le GLU inhibe le MBON-11 au travers des récepteurs GluCl α . Cette inhibition maintient le MBON-11 à un niveau d'activité basale qui assure une agressivité normale chez la drosophile. L'activité GLU du VPM4 pourrait être régulé par ses récepteurs mGluR pré-synaptique dont le rôle serait de limiter la présence du GLU dans la fente synaptique et donc diminuer son activité sur le neurone post-synaptique.

L'activité GABA du MBON-11 détermine la régulation de l'agressivité. Une activité normale assure une agressivité normale. S'il en libère trop, il engendre de la boxe. Pour limiter cet excès d'activité, une boucle de rétrocontrôle passe par les récepteurs Rdl et GABA $_B$ -R3 pour permettre au MBON-11 de s'auto-inhiber.

Par conséquent, les comportements agressifs dérégulés tels que la boxe surviendraient dès lors que les MBON-11 sont désinhibés. Ce défaut d'inhibition pourrait s'expliquer par trois mécanismes possibles : 1) le récepteur GluCl α pourrait être désensibilisé suite à ses activations répétées. Ces phénomènes de perte de sensibilité ont déjà été observé avec la sous-unité GluCl- α 2 (Pemberton et al., 2001) et les récepteurs ionotropiques au GLU (Aittoniemi et al., 2023; Sibarov & Antonov, 2018). Ainsi, GluCl α perdrait alors en efficacité voire en nombre à la surface du MBON-11, les entrées inhibitrices n'exercent plus leur inhibition sur les MBON-11, et leur activité augmente en conséquence. *In fine*, cela aboutirait aux phénomènes de boxe. 2) Si un excès de glutamate est relargué dans la fente synaptique, il se pourrait qu'il y ait saturation

des récepteurs $\text{GluCl}\alpha$ et que le glutamate se fixe à d'autres récepteurs glutamatergiques excitateurs comme NMDAR1 et/ou 2, que l'on sait être exprimé à la surface des MBON-11 grâce à des données de transcriptomiques publiées (Aso et al., 2019) et immunohistochimiques (Prunier et al., en préparation). NMDAR2 ayant un rôle excitateur, son action pourrait surpasser celle du récepteur inhibiteur $\text{GluCl}\alpha$. Ainsi, le MBON-11 serait suractivé par l'action des récepteurs NMDAR2, et cette suractivation provoquerait l'escalade en phénomènes de boxe. 3) La dérégulation pourrait provenir d'une désensibilisation de la boucle de rétrocontrôle GABA du MBON-11 lui-même. Ce phénomène est connu chez les récepteurs au GABA (Field et al., 2021; Gielen et al., 2015). Ainsi, les récepteurs Rdl ou $\text{GABA}_B\text{-R3}$ pourraient être désensibilisés par l'activité continue du MBON-11. Tout input GABA inhibiteur aux MBON-11 utilisant ces récepteurs perdrait en capacité d'inhibition, que ce soit sa boucle de rétrocontrôle ou n'importe quel autre partenaire GABAergique en amont. Ce défaut d'inhibition amènerait l'augmentation de l'activité du MBON-11 et par la même à une augmentation du phénomène de boxe.

Pour démêler ces hypothèses les unes des autres, les prochaines étapes devront inclure des techniques d'imagerie plus poussées. D'abord pour s'assurer que le glutamate du VPM4 est bien transmis via les $\text{GluCl}\alpha$ en post-synaptique, il est nécessaire de vérifier par marquage immunohistochimique la répartition spatiale du $\text{GluCl}\alpha$ au niveau des dendrites du MBON-11 tout en marquant les projections axonales des VPM4. Si notre hypothèse se vérifie, nous nous attendrions à ce que le VPM4 projette ses axones au niveau des dendrites du MBON-11 où le marquage des $\text{GluCl}\alpha$ est présent.

Dans un second temps, pour éprouver la désensibilisation des récepteurs $\text{GluCl}\alpha$, Rdl et $\text{GABA}_B\text{-R3}$, nous pourrions procéder à des études électrophysiologiques. Celles-ci nous permettraient d'observer le phénomène de désensibilisation de ces récepteurs et de sa dynamique : au bout de combien de temps d'activation les récepteurs se désensibilise, quelle est l'intensité de cette désensibilisation, pour quelle durée... Si notre supposition est exacte, nous nous attendrions à observer une désensibilisation pour chacun de ces récepteurs.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Expliquer les observations

Hypothèses sur le fonctionnement des comportements et des neurones

Ouverture et suite du projet

1. Expliquer les conséquences de l'agressivité

Le premier chapitre de ma thèse répond à la question des conséquences d'une défaite ou d'une victoire sur l'adaptabilité sociale (*i.e.* territorialité et succès reproducteurs) des individus. Nous avons mis en évidence que la défaite d'un combat réduit de suite la territorialité des drosophiles. Au regard des comportements reproducteurs, les perdants montrent moins de motivation à courtiser une heure après la défaite lorsqu'ils sont seuls avec une femelle. En contexte compétitif, la performance de cour (*i.e.* chance de copuler en premier, d'avoir un CVI élevé et durée de copulation) des perdants est diminuée comparée aux gagnants. Enfin, nos résultats montrent que ces effets ne dépendent pas d'un phénomène de préférence des femelles vis-à-vis des mâles sur la base d'indice chimique, *i.e.* le profil d'HC, ni d'un défaut de perception des mâles du sexe des conspécifiques.

1.1. Les mécanismes en jeu lors d'une victoire ou d'une défaite

Il est connu que chez la drosophile, perdre ou gagner un combat engendre des conséquences plus larges que la simple probabilité de remporter ou de perdre un combat. En effet, ils peuvent se généraliser à d'autres comportements comme la prise de risque (*i.e.* traverser un trou de 3mm), l'exploration ou les comportements reproducteurs (Filice & Dukas, 2019; Kim et al., 2018; Teseo et al., 2016). Les gagnants prennent par exemple plus de « risques » en traversant plus souvent le trou que les individus n'ayant pas combattu, eux-mêmes traversant plus que les perdants (Kim et al., 2018). Cela pourrait indiquer d'une part une plus grande tendance à la témérité chez les gagnants, et d'autre part plus de prudence de la part des perdants. De plus, les gagnants ont un comportement exploratoire plus marqué en ce sens qu'ils approchent plus vite et plus près un nouvel objet que les perdants, qui pourrait s'expliquer par la plus grande témérité que nous venons de mentionner (Kim et al., 2018). Concernant la cour, l'influence de l'effet loser est fréquemment retrouvé : les perdants sont moins motivés et tentent moins d'accouplement que les gagnants, ce qui aboutit à une perte de chance pour les perdants de s'accoupler (Filice & Dukas, 2019; Kim et al., 2018; Teseo et al., 2016). En revanche, l'avantage procuré par l'effet gagnant par rapport à un groupe n'ayant pas combattu est plus rare et semble reposer davantage sur une répétition des victoires là où une seule défaite engendre des conséquences néfastes sur la reproduction (Kim et al., 2018). Dans notre étude, nous avons

DISCUSSION GENERALE

investiguer les effets d'une victoire ou défaite sur les comportements de territorialité et reproducteurs et comprendre au bout de combien de temps ces effets sont observables.

Les conséquences de la défaite observées chez les perdants pourraient s'expliquer par 3 mécanismes différents que nous allons argumenter. 1) Les perdants ont de moins bonnes performances dans l'exécution des comportements reproducteurs. Notre étude semble infirmer cette éventualité. En effet, si tel était le cas, nous aurions observé des différences dans le comportement de cour hors contexte de compétition chez les perdants. Or, seule la motivation au bout d'une heure est diminuée chez ces derniers. Hors compétition, les autres indicateurs de cour tels que le CVI et le temps d'accouplement des perdants sont comparables aux gagnants. De plus, la motivation seule ne saurait expliquer la perte en probabilité de montrer un CVI élevé ou en temps de copulation chez les perdants en compétition. En effet, dans un contexte compétitif, les perdants ont autant de probabilité d'émettre le premier comportement de cour que les gagnants. Cela suggère que leur motivation est augmentée par la compétition. Pour ces raisons, il est difficile d'affirmer que l'effet loser repose uniquement sur les comportements du perdant.

2) L'effet loser repose sur une préférence des femelles. Pareillement, nos observations infirment cette possibilité. Du moins, dans une certaine mesure. En effet, nos tests de préférence indiquent que les femelles ne montrent pas d'attrance ou de répulsion particulière pour les gagnants ou les perdants mais uniquement sur la base des indices chimiques issus des HC car les mâles étaient décapités. Cela était dans le but de standardiser les interactions mâles-femelles en évitant toute interférence du comportement des mâles entre eux et avec ceux de la femelle. Toutefois, cela retire de l'analyse tout un ensemble de comportements permettant de marquer une préférence. En effet, le chant émis par les mâles par exemple résulte d'une interaction dynamique avec la femelle pour en moduler la teneur (*i.e.* les *pulse* qui sont des successions de pics de chant court mais de forte intensité ; et les *sine* qui sont plus long mais de faible intensité) : le taux de *pulse* augmente face à une femelle en mouvement pour augmenter sa réceptivité par exemple (Trott et al., 2012). Or si les gagnants et perdants diffèrent dans leur capacité à adapter leur chant pour rendre réceptive la femelle et lui induire une préférence, cela ne peut être mesuré que les individus sont vivants. Le chant a déjà été montré comme source de préférence chez les drosophiles, en faveur des mâles qui émettent un chant en ayant des ailes symétriques (Vijendravarma et al., 2022). Nous pourrions hypothétiser qu'en plus d'une motivation plus faible, le perdant aurait ses ailes abîmées par le combat et aurait par conséquent un chant de moins bonne qualité, favorisant le gagnant. Idem, c'est un paramètre qui ne peut être évalué

DISCUSSION GENERALE

que si les drosophiles sont vivantes. Enfin, d'autres facteurs comportementaux pourraient être perçus par les drosophiles comme les attaques portés par les mâles entre eux par exemple qui pourraient également permettre à la femelle d'identifier et préférer un mâle selon son agressivité (Monyak et al., 2021).

3) Le mâle dominé ne cherche pas à courtiser les femelles à cause d'une altération de son système sensoriel, ou à cause d'un dépôt de phéromones mâles anti-aphrodisiaques par le mâle dominant suite au combat. Nos observations infirment cette possibilité car les mâles perdants et gagnants arrivent parfaitement à distinguer les mâles et les femelles et à préférer assez largement cette dernière sur la seule base des HC.

4) Le comportement du gagnant interfère avec le comportement du perdant. Cette fois-ci, nos résultats vont en ce sens. En contexte compétitif pour une femelle, les perdants ont moins de chance de s'accoupler, ont une plus faible probabilité d'avoir un CVI élevé et ont un temps de copulation plus court lorsqu'ils y parviennent. Suite à la défaite, le perdant est susceptible de montrer une plus grande variabilité voire une altération dans son comportement de cour hors compétition : une motivation plus faible, quand bien même celle-ci soit augmentée par le contexte compétitif, et une plus grande variabilité dans sa durée d'accouplement. Face à la pression exercée par le gagnant, les comportements de cour du perdant deviennent moins performants. C'est donc cette interaction gagnant/perdant lors du combat qui est le mécanisme permettant à l'effet loser d'exister.

Le fait que les conséquences délétères de la défaite sur la cour (*i.e.* moins de chance de s'accoupler, moins de durée d'accouplement et plus faible probabilité d'avoir un CVI élevé) ne soient visibles qu'au bout d'une heure semble suggérer que des processus lents sont à l'œuvre. Deux processus peuvent être envisagés. 1) Le processus de modification du profil des HC des mâles qui pourrait leur permettre de signaler leur statut aux congénères (Dembeck et al., 2015; Rutte et al., 2006). 2) La formation de la trace mnésique à court terme de l'expérience vécue au moment du combat. Il semblerait qu'environ une heure soit nécessaire pour former cette trace (Davis, 2023; Pavlowsky et al., 2018), ce qui coïncide avec le délai que nous observons.

1.2. L'hypothèse des indices sociaux

Même si le profil des HC des mâles gagnants et perdants n'interfère pas dans la préférence des femelles, et que les mâles parviennent à distinguer correctement mâle et femelle, nous ne pouvons exclure dans ce chapitre la possibilité d'une interférence mâle-mâle sur la base des HC. Ces indices sociaux (*e.g.* signes de fatigue, blessures, phéromones...) permettent à un individu de prédire les capacités de son adversaire (Rutte et al., 2006). Le dépôt de signaux chimiques pour marquer un territoire et moduler le comportement des femelles en conséquence existe chez d'autres espèces vertébrés (Martinovic-Weigelt et al., 2012). Similairement, des composés volatiles comme l'hormone adrénocorticotrope, mobilisée dans l'axe corticotrope *i.e.* l'axe du stress, est capable d'induire la soumission lorsque propagée dans l'air par le biais de l'urine (McGlone, 1985).

De tels phénomènes pourraient être à l'œuvre chez la drosophile pour marquer un territoire et inhiber la compétitivité des mâles perdants. En effet, il a été montré qu'une drosophile perdante a d'autant plus de chance de perdre un combat subséquent si celui-ci se déroule dans la même arène que le premier combat (Trannoy & Kravitz, 2017). De plus, la drosophile est capable d'exploiter un certain nombre d'indices environnementaux pour évaluer la pression de l'environnement. Par exemple, la compétition spermatique est évalué au travers d'indices chimiques comme le taux de rencontre mâle-mâle (Churchill et al., 2020), le temps d'exposition aux rivaux (Rouse & Bretman, 2016) ou leur nombre (Nandy et al., 2016). Cela suggère que la seule perception d'un rival peut impacter le comportement des individus, et donc potentiellement la présence d'un gagnant peut impacter le comportement d'un perdant. Ces auteurs montrent que cela leur permet d'adapter leur comportement reproducteur en conséquence, notamment en allongeant le temps de copulation, et donc la garde de partenaire, en augmentant la quantité et la qualité de sperme produit, ou encore en montrant plus ou moins d'agressivité envers les autres compétiteurs. Compte tenu de ces éléments, investiguer l'importance des indices sociaux me semble pertinent. Pour cela, nous pourrions mener un combat dans une arène puis tester subséquemment les deux membres de la dyade dans une nouvelle arène propre et tester la territorialité des gagnants et perdants au sein de cette nouvelle arène. Si ces indices sont nécessaires, nous nous attendrions à voir une territorialité normale ou moins impacté par la défaite chez les perdants au sein de la nouvelle arène.

1.3. L'hypothèse contexte dépendant

Dans le chapitre 1, nous avons fait combattre les mâles autour d'une compétition pour un territoire et des ressources alimentaires. Nous avons par la suite testé les comportements de cours seul ou en compétition avec un rival. Nous venons de le mentionner, la présence de rival module les comportements sociaux (Churchill et al., 2020; Nandy et al., 2016; Rouse & Bretman, 2016). Une expérience alternative à celle que nous avons faite consisterait à induire l'effet winner et loser d'ores et déjà dans un contexte compétitif pour une femelle plutôt que pour un territoire et de la nourriture. L'hypothèse que j'émetts derrière cette expérience serait de dire que les conséquences de l'effet loser serait amplifié en l'établissant déjà dans un contexte de compétition pour une femelle.

2. Expliquer les conséquences des modifications neuronales

Dans le second chapitre de ma thèse, nous avons questionné les mécanismes neuronaux et moléculaires sous-tendant une dérégulation du comportement agressif. Nous avons centré notre intérêt sur le VPM4 et sa transmission glutamatergique, ainsi que sur le MBON-11 en tant que principale sortie du VPM4. Nous avons montré qu'une activation conditionnelle des neurones VPM4 dérégulait l'agressivité, et que seul l'augmentation du relargage de GLU provoquait cette même dérégulation. De la même façon, l'activation des neurones MBON-11 dérégule l'agressivité. Le récepteur GLU inhibiteur $\text{GluCl}\alpha$ présent à la surface des neurones MBON-11 permet de lier le Glu relargué par le VPM4 et est nécessaire pour réguler l'activité du MBON-11, mais le rôle de NMDAR2 reste incertain. Aussi, nous avons montré que l'activité GABAergique du MBON-11 était responsable de cette régulation. En effet, augmenter l'activité du MBON-11 par dTrpA1 engendre une augmentation de la boxe. A l'inverse, inhiber le relargage du GABA du MBON-11 lorsque l'activité de celui-ci est augmentée n'engendre plus de dérégulation comportementale, mettant en avant le rôle de la voie de signalisation GABAergique du MBON-11 dans le processus de régulation des comportements agressifs. Similairement, inhiber la dégradation du GABA par la GABA-transaminase dans les MBON-11, ayant pour conséquence d'augmenter le taux de GABA disponible, dans les neurones, augmente le nombre de boxe et de *lunges* également. Enfin une boucle de rétro-contrôle inhibitrice de l'activité des neurones MBON-11 via les récepteurs au GABA Rdl et $\text{GABA}_B\text{-R3}$ semble nécessaire pour maintenir l'activité des MBON-11 à un niveau basal et ainsi

permettre l'expression de comportements agressifs appropriés. Nous faisons l'hypothèse que le MBON-11 lui-même utilise ces récepteurs pour agir sur sa propre activité par sa boucle de rétrocontrôle.

2.1. Qualifier la nature de l'agressivité engendrée

Nous l'avons vu au cours du chapitre 2, activer les MBON-11 engendre une forme d'agressivité outrée au moins, voire d'hyperagressivité. Nous avons défini dans l'introduction que l'agressivité outrée se caractérisait seulement par un défaut d'inhibition. Le contexte et le contenu, c'est-à-dire les raisons motivant un combat et sa séquence rituelle, sont intacts. L'hyperagressivité quant à elle n'a ni inhibition, ni contenu. Un combat hyperagressif atteint rapidement les hautes intensités de combat sans respecter la gradation progressive du conflit. Pour rappel, chez la drosophile, la séquence normale commence par des menaces d'ailes puis escalade en *lunges*. La répétition des séquences menaces-*lunges* émises par la même drosophile attaquante aboutit à la dominance.

Ainsi, pour distinguer l'une de l'autre dans notre cas, il faudrait *a minima* dénombrer le nombre de menaces d'aile pour s'assurer d'une présence de menaces annonçant les attaques. Idéalement, ce nombre de menace devrait être équivalent au nombre d'attaques, voir l'excéder. Toutefois, il serait mieux de resituer ces menaces dans la dynamique de l'interaction et voir si la séquence rituelle de répétitions de menace-attaque, le contenu, est bien respectée. Les *lunges* et les événements de boxe restent néanmoins de bons proxys pour distinguer l'agressivité « normale » d'une agressivité outrée. En ce sens nous pouvons au moins nous prononcer à cet égard et dire que des phénotypes observés au cours du chapitre 2 s'apparentent à de l'agressivité outrée. Dans nos travaux, les menaces d'ailes n'ont pas été analysées, d'une part car il s'agit d'un paramètre peu étudié en général dans la littérature, mais également pour des raisons pratiques, en allégeant ainsi le scorage manuel. Ceci étant dit, l'activation des MBON-11 ne dérégule l'agressivité que lorsque le contexte prête au combat, *i.e.* lorsque les drosophiles sont en compétition pour des ressources attrayantes comme un territoire rempli de nourriture et non d'agar. Par conséquent, il n'agit pas comme un bouton « Marche/Arrêt » de l'agressivité qui amènerait les drosophiles à entreprendre et escalader un combat sans raisons lorsque ces neurones seraient plus actifs que l'état basal. Le contexte est alors conservée dans notre cas, ce qui exclut la possibilité de considérer l'agressivité observée de violence selon les critères de Natarajan & Caramaschi (Natarajan & Caramaschi, 2010). Cette observation nous amène

malgré tout à réfléchir autour de plusieurs hypothèses explicatives sur comment le MBON-11 dérégule l'agressivité.

2.2. L'hypothèse d'une attribution de valeur biaisée

Nous l'avons évoqué, l'activité du MBON-11 suscite l'approche, tandis qu'une activité neuronale amoindrie prédit la punition et incite l'évitement (Kim et al., 2018; König et al., 2019; Perisse et al., 2016). Il est possible que l'augmentation de l'activité des MBON-11 biaise la valeur attribuée aux ressources voire aux attaques reçues lors des combats, plutôt que d'agir sur les comportements agressifs en eux-mêmes. Cette valeur serait biaisée en faveur d'une plus grande valeur à la ressource qu'elle ne l'est réellement, ou une valeur moins aversive aux attaques reçues. Dans les deux cas, ces valeurs biaisées pourraient justifier l'escalade du combat jusqu'à la boxe. Pour la tester, une possibilité serait de reprendre les travaux de Lim et collaborateurs et de proposer un gradient de concentration de nourriture tout en activant les MBON-11 (Lim et al., 2014). Si l'activation de ces neurones biaise la perception de la valeur des ressources, je m'attendrai alors à observer une intensité des comportements agressifs plus élevée pour le génotype expérimental à des concentrations de nourriture moindres comparé aux drosophiles contrôles.

Le biais de la valeur pourrait également s'appliquer aux individus eux-mêmes. En effet, comme le MBON-11 promeut l'approche, il peut être envisageable que le MBON-11 favorise l'approche de l'adversaire en tant qu'indice social pertinent. Il n'est pas à exclure que l'augmentation de l'agressivité soit liée à un plus grand nombre de rencontre. Pour palier à ce biais, il est possible de rapporter le nombre d'attaques observées par le nombre de rencontres mâles-mâles. Nous avons préféré dénombrer le nombre d'attaque total car ce rapport attaques/rencontres induit une charge d'analyse non négligeable en plus d'induire de nouveaux biais comme une sous évaluation de l'agressivité (*e.g.* une première rencontre pendant laquelle a lieu beaucoup d'attaques est suivie par plusieurs rencontres avec très peu d'attaque).

Les valeurs attribuées aux éléments de l'environnement sont déterminantes dans le calcul bénéfice-risque (Blanchard et al., 2011). Or, vis-à-vis de la prise de risque (traverser un trou de 3mm) et de l'exploration de nouveaux objets, nous savons que les drosophiles gagnantes sont plus téméraires, et les perdantes plus prudentes (Kim et al., 2018). Nous l'avons vu en introduction, cette témérité peut amener les individus à prendre des risques pour leur propre

intégrité dans le cas où leur agressivité est pathologique, en traversant une grille électrifiée pour attaquer un congénère par exemple (Lagerspetz, 1964) Le risque et l'exploration sont deux composantes mobilisées au cours d'une interaction agressive. Il me semble intéressant de tester la prise de risque et l'exploration chez des drosophiles dont les neurones MBON-11 et/ou VPM4 sont activés. Le test de prise de risque en particulier me semble pertinent car il mobilise le calcul-bénéfice risque dans son ensemble. Proposer une tâche de prise de risque ou d'ambiguïté comme la traversée d'un trou aux drosophiles pourraient nous permettre d'élucider plusieurs questions : 1) L'activité des MBON-11 et/ou du VPM4 biaise-t-il l'évaluation du risque ? Si tel est le cas, activer ces neurones devraient induire plus de traversées du trou comparativement aux contrôles. 2) L'activité de ces neurones biaise-t-il la valeur de la ressource ? Dans ce cas nous pourrions ajouter de l'autre côté du trou une récompense de valeurs différentes : pas de récompense, petite récompense (nourriture standard) ou grosse récompense (nourriture appétante comme du jus de pomme ou de la levure réhydratée). Nous devrions observer plus de traversée si une ressource de faible valeur est placée au-delà du trou dans le génotype expérimental plutôt que les contrôles, d'autant plus si la ressource est attractive. Enfin 3) l'activité de ces neurones biaise-t-il la valeur du stimulus nocif ? Il faudrait dans ce cas proposer une prise de risque face à un stimulus aversif d'intensité variable comme la traversée d'un point plus ou moins chaud ou électrifié plus ou moins fortement. Si l'activité des neurones biaise la valeur perçue de la punition, nous devrions voir plus de drosophile traverser des stimuli de haute intensité. Si nos hypothèses se confirment, nous pourrions ensuite supposer que ces tendances se transposent aux combats, et pourraient alors expliquer la boxe que nous observons.

2.3. L'hypothèse d'une mémoire altérée

Les MBON-11 ont été impliqués dans les processus mnésiques : les dépressions synaptiques entre CK et MBON-11 permettent aux drosophiles d'apprendre à éviter un stimulus associée à une punition (Perisse et al., 2016). Autrement dit quand une odeur, *i.e.* un pattern d'activation de CK, est associée à une punition, ce pattern engendre une réponse moins forte du MBON-11. Ce processus repose sur une coïncidence odeur/punition dépendant de la dopamine des DANs et de l'activité des CK (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Plaçais et al., 2017). En particulier pour les MBON-11, le processus repose sur les interactions entre eux et les PPL1-01, les DANs transmettant les informations relatives aux punitions, définies selon une fenêtre temporelle bien

DISCUSSION GENERALE

précise (Jia et al., 2021; Kim et al., 2018; Pavlowsky et al., 2018). Nous savons également que lorsqu'une odeur est associée au combat, l'activité du MBON-11 est nécessaire pour y attribuer une valence selon l'issue du combat (positive en cas de victoire, négative en cas de défaite) (Kim et al., 2018). Inhiber l'activité du MBON-11 au moment de l'apprentissage supprime l'aversion des perdants envers l'odeur associée à la défaite.

Or, dans nos expériences, l'activité du MBON-11 est contrainte par une activation phasique par dTRPA1. Il est possible que cette activation interfère avec les processus mnésiques et altère la mémoire des individus. Les MBON-11 n'arrivent peut-être plus à encoder correctement les nouvelles informations provenant du combat telles que les attaques reçues ou encore l'évaluation des capacités de leur adversaire ou de leur propre capacité. Ce faisant, l'escalade est plus fréquente. Pour tester cette hypothèse, une première étape pourrait consister en la reprise du protocole de Kim et collaborateurs qui associe odeur et combat (Y.-K. Kim et al., 2018), activer les MBON-11 pendant ces combats et tester la mémoire des drosophiles vis-à-vis de l'odeur associée. Deux résultats me semblent possibles : 1) Soit l'activité constante des MBON-11 perturbe le fonctionnement des processus mnésiques en eux-mêmes, auquel cas je m'attendrais à un défaut d'encodage et donc d'apprentissage de la part des drosophiles tant gagnantes que perdantes : elles ne feraient preuve d'aucune préférence. 2) Soit l'activité constante du MBON-11 biaise la valeur encodée en mémoire associée à l'odeur, auquel cas les drosophiles gagnantes pourraient montrer d'autant plus de préférence pour l'odeur, et les perdantes pourraient montrer soit une préférence plutôt qu'une aversion. Néanmoins, comme il n'était pas rare d'observer des drosophiles escalader très rapidement voire instantanément le combat, ce n'est pas l'hypothèse que je privilégierai le plus, par rapport à celle d'une valeur biaisée par exemple.

L'utilisation du transgène thermosensible UAS-dTrpA1 présente le désavantage d'engendrer une certaine inertie avant l'activation neuronale. La précision temporelle est assez relative, et l'activité neuronale induite tient plus d'une activité synaptique phasique plutôt que tonique. Une méthode alternative à la finesse temporelle beaucoup plus précise serait d'utiliser des techniques d'optogénétique. En effet, les neurones peuvent être activés avec des channelrhodopsines, des canaux ioniques dont le changement de conformation est induit par la lumière. L'un d'eux que nous avons tenté d'utiliser est Chrimson, sensible à la lumière rouge (Klapoetke et al., 2014). Nous avons commencé à activer les neurones MBON-11 par optogénétique avec le but ultime de pouvoir activer ces neurones seulement au moment où une attaque serait donnée ou reçue. Ce protocole aurait nécessité une adaptation du dispositif en ne

testant qu'une dyade à la fois pour pouvoir correctement délivrer la stimulation lumineuse. Néanmoins, par manque de temps, nous n'avons pas pu aller jusqu'au bout de l'optimisation du protocole expérimental qui demeure une piste ouverte pour les travaux à venir.

2.4. L'hypothèse des DANs et d'un système de récompense

La dopamine permet d'associer par détection de coïncidence une valeur de punition ou de récompense à un stimulus via deux populations de DANs : les PPL1 pour la punition et les PAM pour la récompense (Aso, Sitaraman, et al., 2014). Ces DANs permettent les dépressions synaptiques entre les CK et les MBONs qui sous-tendent l'approche ou l'évitement, selon la nature de la valence associée à l'activation des CK (Davis, 2023). Or, les PPL1-01, une sous-population des PPL1, sont les neurones envoyant le plus d'inputs aux MBON-11 et en retour les MBON-11 connectent avec les PPL1-01 d'après les données de connectomiques disponibles. En temps normal, l'interaction entre ces neurones assure la création de la mémoire à court-terme (Pavlovsky et al., 2018). Mais en augmentant artificiellement l'activité neuronale des MBON-11, avec UAS-dTrpA1 par exemple, nous serions dans un cas où les PPL1 subiraient une inhibition constante de la part des MBON-11. L'activité des PPL1 étant nécessaire pour attribuer les valences de punition en déprimant les synapses KC/MBONS favorisant l'approche (Aso, Sitaraman, et al., 2014; Modi et al., 2020), il est envisageable de faire l'hypothèse que cette dépression synaptique n'est plus assurée correctement, favorisant l'approche là où elle ne devrait pas l'être. Pour la tester, des études préliminaires au laboratoire ont entrepris d'inhiber les PPL1 avec shibire^{ts} pour comprendre si bloquer l'activité des PPL1 et donc la plasticité synaptique entre CK et MBON-11 inhiberait la perception des punitions engendrée par une attaque par exemple. Sans ce renforcement négatif, l'escalade pourrait être facilitée et nous observerions plus de phénomènes de boxe. Les premiers résultats suggèrent qu'aucun phénotype agressif particulier allant vers une hausse ou une baisse n'a été observé (données non montrées). Une alternative plus proche d'un fonctionnement « normal » mais plus complexe à mettre en œuvre passerait par l'emploi de l'optogénétique, où nous pourrions inhiber ou activer les PPL1 au moment où des attaques sont données, et voir si cela favorise ou non l'escalade du combat. De la même façon, cela exigerait une adaptation du dispositif pour ne tester qu'une dyade à la fois.

La dopamine est largement impliquée dans le circuit de récompense chez les vertébrés. Chez les invertébrés, l'octopamine peut aussi jouer ce rôle (Perry & Barron, 2013). Ces mêmes

DISCUSSION GENERALE

auteurs rassemblent des éléments suggérant un rôle propre à la dopamine et à l'octopamine dans l'apprentissage des valences. Ainsi, il a été montré dans le cadre d'apprentissage associatif olfactif qu'inhiber avec sh^{1s} les neurones dopaminergiques réduit l'apprentissage aversif, tandis que réduire l'expression de l'enzyme tyramine- β -hydroxylase qui synthétise l'OA ne réduit que l'apprentissage appétitif (Schwaerzel et al., 2003). Des études plus récentes suggèrent que les relations entre OA, DA et les apprentissages pourraient être plus complexes. En effet, le récepteur à l'octopamine Oct β 1R a été impliqué dans l'apprentissage olfactif aversif et appétitif en fonction de l'endroit où il est exprimé : dans les lobes α/β , il permet l'apprentissage aversif, tandis que dans les neurones de projections il permet l'apprentissage appétitif (Sabandal et al., 2020). De la même façon, le récepteur dDA1 dans les CP est nécessaire pour les apprentissages olfactifs appétitifs et aversifs (Kim et al., 2007). Ainsi, ces monoamines seraient mobilisées tant pour les punitions que pour les récompenses (Selcho, 2024). Certains auteurs suggèrent d'ores et déjà que le VPM4 pourrait agir comme détecteur de réussite dans le cadre de l'alimentation, en inhibant la recherche de nourriture et en promouvant la prise alimentaire (Sayin et al., 2019; Youn et al., 2018). Compte tenu de ces éléments, il peut être envisagé que le VPM4 ait un rôle plus large. Si son activité permet l'expression de prise alimentaire, *i.e.* de consommation de la récompense, peut-être que son inactivité est également un signal favorisant les comportements motivés qui permettent d'atteindre un but. Ce faisant, l'OA du VPM4 jouerai un rôle dans un circuit de récompense en tant que déclencheur de comportements motivés et des comportements de prise de récompense au moins dans le cadre de l'alimentation.

Il me semble intéressant d'investiguer un rôle plus large de ce VPM4 dans le cadre des comportements motivés, au-delà du « détecteur de succès de prise alimentaire ». D'une part, nos résultats suggèrent que l'augmentation de la transmission de GLU du VPM4 augmente le nombre de phénomènes de boxe, et que l'inhibition de l'OA chez d'autres neurones engendre une diminution de l'agressivité d'après la littérature (Andrews et al., 2014; Asahina, 2017; Hoyer et al., 2008; Zhou et al., 2008). Il serait nécessaire de tester si dans les VPM4, la diminution de la transmission OA en sous-exprimant VMAT induit les mêmes conséquences que dans les autres neurones OA. Pour l'heure, nous ne pouvons que confirmer que le GLU au sein du VPM4 est nécessaire pour réguler l'agressivité. A mon sens, une hypothèse pas des plus parcimonieuse mais intéressante consisterait à attribuer un rôle fonctionnel au VPM4 au sein d'un système de récompense qui reste à définir. Les principaux neurones composants ce système sont pour le moment les CK, les MBONs et les DANs associés (Dvořáček & Kodrík, 2021). Le rôle du VPM4 ici serait que son activité induite par la découverte de nourriture

enclencherait une forme de récompense par le biais des comportements de prise alimentaire (Sayin et al., 2019). Dans le même temps, cette activité normale inhiberait le MBON-11 tant pour cesser la recherche de nourriture (Sayin et al., 2019) que pour maintenir un niveau normal voire inhiber l'agressivité au profit de la nutrition. Or, l'activité du MBON-11 en réponse à une odeur suite à une période de jeûne, est potentialisée (Perisse et al., 2016). Nous pourrions supposer que cette potentialisation est liée à une activité plus faible du VPM4, pour permettre la recherche de nourriture et les comportements associés comme l'agressivité si la ressource est contestée. Pour adresser cette question, nous pourrions commencer par mesurer l'activité des VPM4 à jeûne par des techniques d'imagerie calcique *in vivo*. Si l'activité des VPM4 est inhibé par des odeurs ou le goût, cela irait dans le sens de notre idée supposant que les MBON-11 seraient moins inhibé par les VPM4 dans un contexte de jeûne. Au contraire, si l'activité du VPM4 est potentialisée par les odeurs, nous devrions observer une augmentation de l'activité du MBON-11 en réponse au VPM4. En effet, il serait possible, comme décrit précédemment, que les récepteurs inhibiteurs GluCl α perdent en sensibilité ou soit saturés. Dans ce cas, le MBON-11 pourrait être activé par le biais de ses récepteurs NMDAR2, ce qui aboutirait alors à une augmentation des phénomènes hyperagressifs. Le contexte de jeûne pourrait ainsi impacter les activités des MBON-11 et VPM4 de façon à moduler la recherche de récompense et à la motiver, ce qui pourrait augmenter l'agressivité des drosophiles. Mais une autre interprétation est néanmoins possible au regard de l'état interne de la drosophile : ces neurones peuvent-ils être impliqué dans la perception de la faim ?

2.5. L'hypothèse d'un état interne altéré

Compte tenu des rôles décrits précédemment des neurones VPM4 et MBON-11 par rapport aux comportements alimentaires (approche des odeurs, prises alimentaires, activité potentialisé par le jeûne) (Perisse et al., 2016; Sayin et al., 2019; Youn et al., 2018), il n'est pas à exclure que l'état interne des drosophiles, ou la perception de différents états internes en eux-même puisse être altéré. Il a été rapporté que l'activation du MBON-11 pourrait mimer les effets de la faim, alors que son inhibition les inhiberait (X. Zhang, communication personnelle à l'APDNC3, 27 février 2024). Nous aurions alors toutes les conditions réunies pour engendrer une escalade de l'agressivité : lors de l'activation des MBON-11 avec le transgène UAS-dTrpA1, les drosophiles auraient donc une sensation de faim mais disposeraient de toutes leurs

DISCUSSION GENERALE

ressources énergétiques pour exprimer des comportements agressifs, ce qui pourrait expliquer les phénomènes de boxes observés lorsque ces neurones sont activés.

Une étude a déjà mis en évidence l'impact du jeûne sur l'augmentation de l'agressivité chez les mâles (Edmunds et al., 2021). Pour tester le fait que l'influence du jeûne sur l'agressivité passe par l'activité des MBON-11, des études au laboratoire ont été menées pour activer les MBON-11 pendant une compétition suite à une période de jeûne. Deux résultats sont possibles : 1) soit la faim ressentie est d'autant plus grande en activant les MBON-11 suite à une période de jeûne auquel cas nous observerions une agressivité augmentée en activant les MBON-11 d'autant plus grande que les drosophiles sont à jeun. 2) Soit un effet plateau s'applique à la perception de la faim, auquel cas nos individus à jeun ne peuvent pas ressentir encore plus de faim et les comportements agressifs entre les groupes à jeun et à satiété devraient être équivalents lorsque le MBON-11 est activé. Nos résultats tendent à montrer que les drosophiles dont les MBON-11 sont activés et ont subi une période de jeûne montrent une tendance à avoir plus de comportements agressifs de très haute intensité. Seulement, ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs par rapport aux drosophiles dont les MBON-11 sont activés et n'ayant pas subi de période de jeûne.

2.6. La piste ouverte par la double-transmission

2.6.1. Un modèle de relargage à définir, et un rôle de l'OA à explorer

Nos résultats sont en accord avec ce qui a été montré précédemment par Sherer et collaborateurs (Sherer et al., 2020). Nous avons montré que le GLU et l'OA relargué par le VPM4 ont des rôles fonctionnellement distincts au regard de l'agressivité. Pour rappel, 4 modèles de fonctionnement sont possibles dans le cas de la double transmission (El Mestikawy et al., 2011) : 1) le VPM4 ne relargue que le GLU ; 2) le VPM4 ne relargue que l'OA ; 3) le VPM4 co-relargue le GLU et l'OA en quantité égale ; 4) le VPM4 co-relargue le GLU et l'OA, ce-dernier étant en plus grande quantité grâce au processus de synergie vésiculaire permis par la présence de GLU dans les vésicules. Les travaux de Sherer et collaborateurs ont montré que la co-expression de VMAT et dVGLUT n'est pas uniforme dans le VPM4, mais qu'elle se fait seulement au niveau de certaines synapses, quand d'autres ne vont exprimer qu'un seul des deux transporteurs (Sherer et al., 2020). En ce sens, il est possible que les synapses du VPM4 puissent suivre différents modes de fonctionnement selon les transporteurs vésiculaires exprimés. Concernant les synapses entre le VPM4 et le MBON-11, plusieurs éléments sont à considérer. D'une part, on observe une augmentation de l'agressivité en activant le relargage de GLU des VPM4, observation que l'on ne retrouve pas en activant le relargage de l'OA des VPM4. Dans ce cas deux possibilités : 1) Soit le GLU assure une fonction qui n'est pas assuré par l'OA, auquel cas le GLU a un rôle plus large que seulement augmenter la quantité d'OA dans la vésicule par synergie. 2) Soit, au contraire, l'augmentation de l'agressivité est sous tendu par l'OA, et l'augmentation de l'expression de dVGLUT dans le VPM4 permet une synergie d'autant plus forte et donc les vésicules contiennent d'autant plus d'OA. Si nous ne voyions aucun effet en augmentant l'expression de VMAT, c'est peut-être parce que le remplissage des vésicules s'est heurté aux limites physiques imposées par les gradients électrique et/ou chimique. Néanmoins, un élément me fait préférer la première hypothèse disant que le GLU a un rôle à part entière dans la connexion VPM4/MBON-11 : l'absence de récepteur OA à la surface du MBON-11 (Aso et al., 2019). Nous serions alors selon moi soit dans un cas de co-relargage, soit de relargage unique du GLU. Et si co-relargage il y a, il est possible que l'OA agisse en pré-synaptique, sur le VPM4 lui-même, en tant que neuromodulateur, comme cela a été précédemment montré (Hidoh & Fukami, 1987; Nishikawa & Kidokoro, 1999; Wu et al., 2008). Il restera à déterminer si cette neuromodulation de l'OA en pré-synaptique se fait

dans le sens d'une inhibition ou d'une excitation du VPM4 en utilisant par exemple des techniques de patch-clamp et mesurer l'activité du VPM4 en réponse à une exposition à l'OA.

Pour s'assurer que la connexion fonctionnelle VPM4/MBON-11 s'effectue bien par le récepteur GluCl α , nous pouvons envisager des expériences d'immunohistochimie. Nous savons de la littérature que le récepteur GluCl α peut avoir un pattern d'expression spatial non uniforme à la surface d'un neurone (Sanfilippo et al., 2024). Il serait enrichissant de savoir si le récepteur GluCl α s'exprime bel et bien sur le MBON-11 préférentiellement au niveau des connexions avec le VPM4 par immunomarquage.

2.6.2. L'imagerie calcique pour établir des liens de causalité

Pour éprouver les liens de causalités entre VPM4 et MBON-11, nous pourrions envisager l'utilisation de techniques d'imagerie calcique en exprimant une sonde calcique qui émet de la fluorescence en présence de calcium, *i.e.* proxy de l'activité neuronale (Dana et al., 2019). En exprimant cette sonde dans les MBON-11 tout en y sous-régulant l'expression de GluCl α et en activant les VPM4, nous pourrions quantifier la fluorescence et donc l'activité engendrée dans les MBON-11 comparativement à lorsque GluCl α est exprimé. Si les VPM4 inhibe bien les MBON-11 par le canal chlorure GluCl α , nous devrions observer une plus forte fluorescence des MBON-11 en réponse à l'activité des VPM4 lorsque GluCl α est sous-exprimé dans les MBON-11. Notons enfin que l'imagerie calcique pourrait nous permettre d'étudier la dynamique d'activation entre VPM4 et MBON-11 sur du plus long terme. Nous mentionnions plus tôt la possibilité selon laquelle l'activité soutenue du VPM4 pourrait désensibiliser les récepteurs GluCl α ou saturer la fente synaptique en GLU au point que des récepteurs excitateurs post-synaptique comme NMDAR2 s'activent et augmentent par conséquent l'activité du MBON-11. Nous pourrions visualiser la fluorescence dans les MBON-11 suite à une activité induite par une trop forte et/ou longue activation des neurones VPM4. Si désensibilisation et/ou saturation il y a, nous nous attendrions à une augmentation de la fluorescence observée dans les MBON-11 seulement après un certain délai. Par ailleurs, nous pourrions appliquer ce protocole en sous-exprimant NMDAR2 dans les MBON-11. Si nous constatons bien une augmentation de l'activité des MBON-11 après un délai suite à une activation soutenue des VPM4, si cela est dû à l'activation des NMDAR2, la sous-expression de ceux-ci devraient au pire allonger le délai nécessaire, au mieux faire disparaître l'augmentation de l'activité neuronale des MBON-11.

Au cours de ce projet, nous avons voulu tester si l'activité des MBON-11 pouvait varier en réponses à des phéromones promouvant l'agressivité : le 7-T et le cVA. Pour ce faire, nous voulions exposer des drosophiles à différentes phéromones tout en analysant la réponse neuronale des MBON-11 par imagerie calcique *in vivo* pour observer. Ces phéromones promouvant l'agressivité tout comme l'activité des MBON-11, nous nous attendions à observer une activité plus intense des MBON-11 en réponse à cette détection pour permettre l'émission de comportement agressif, voire de boxe. Malgré un protocole bien établi et un dispositif permettant de présenter des phéromones *in vivo* sous le microscope (Annexes 1 et 2), des difficultés techniques nous ont contraint à avorter ces explorations au regard du temps imparti. Une méthode alternative pour comprendre quel stimulus sensoriel serait capable d'engendrer une dérégulation de l'agressivité lorsque les VPM4 ou les MBON-11 sont suractivés, consiste à induire des drosophiles dépourvues d'HC. Pour rappel, les oenocytes sont les cellules permettant de synthétiser les HC de la drosophile (Dembeck et al., 2015). Nous pourrions ensuite appliquer sur ces drosophiles des phéromones identifiées et à concentration connue comme cela a déjà pu être fait (Wang et al., 2011). Nous pourrions ainsi tester si des phéromones spécifiques induisent une agressivité dérégulée lorsque les VPM4 ou les MBON-11 sont activés. Nous nous attendrions à une agressivité dérégulée en réponse à une activation de ces neurones suite à la perception de phéromones mâles-spécifiques, comme le 7T ou le cVA. Si aucune réponse comportementale n'est observée, cela pourrait suggérer que les signaux chimiques n'impactent pas l'activité des MBON-11, ou alors que seul un cocktail complexe de phéromones en est capable.

2.7. Un effet spécifique aux mâles

L'escalade de l'agressivité est en temps normal attribuée aux mâles, mais nous avons vu des études qui mentionnaient que les femelles pouvaient être « hyper-agressive », *i.e.* montrer plus d'attaques (Palavicino-Maggio et al., 2019). Les MBON-11 ne présentant pas de dimorphisme sexuel, nous nous sommes alors demandé si son activité pouvait engendrer une forme d'hyperagressivité, ou au moins une agressivité plus élevée, tant chez les mâles que les femelles. Nos résultats montrent que les formes escaladées d'agressivité induites par l'activité des MBON-11 n'est présente que chez les mâles. En revanche, aucun effet sur l'agressivité des femelles n'a pu être observé chez les femelles. Compte tenu du fait que nos résultats montrent que l'activité des MBON-11 impacte spécifiquement les phénomènes de boxes et non les

DISCUSSION GENERALE

lunges, cela pourrait suggérer que l'activité augmentée des MBON-11 n'impacterait que les formes les plus intenses de l'agressivité.

Cette différence *a priori* liée au sexe des individus peut aussi suggérer l'implication de neurones mâles-spécifiques en amont ou en aval des MBON-11 (Chan & Kravitz, 2007). Une prochaine étape serait d'identifier ces neurones dimorphiques en lien fonctionnel direct ou indirect avec les MBON-11. Deux façons de procéder seraient possibles : 1) Soit nous masculinisons le cerveau des femelles pour induire chez elles des comportements agressifs mâles (Fernández et al., 2010; Monyak et al., 2021). Nous activerions ensuite les MBON-11 chez ces femelles au cerveau « masculinisé » pour observer si cela engendre de la boxe tout comme chez les mâles. Nous pourrions ensuite masculiniser un à un les neurones connus pour être dimorphiques comme les mAL, activer les MBON-11 et observer quel neurone masculiné permet au MBON-11 d'engendrer de la boxe lorsqu'il est activé. Nous pourrions ainsi potentiellement mettre en lumière de nouveaux acteurs en lien plus ou moins direct avec le MBON-11 chez les mâles pour déréguler l'agressivité chez qui ces neurones sont « masculinisés » normalement. 2) Soit nous pourrions faire l'inverse c'est-à-dire féminiser des neurones chez le mâle, activer les MBON-11 et observer quels neurones féminisés bloquent la boxe engendrée par l'activation des MBON-11. Cela pourrait nous permettre d'impliquer d'autres acteurs neuronaux chez les mâles dans la dérégulation de l'agressivité si les résultats s'avèrent fructueux.

Nos expériences se sont déroulées dans un contexte particulier par rapport à l'écologie de l'animal à savoir que toutes nos drosophiles testées ont été isolées socialement dès le stade de puppe. Ainsi, toutes nos observations ne sont pour le moment valables que pour des drosophiles mâles isolées. Or, nous l'avons vu en introduction, l'isolement social tend à rendre les individus plus agressifs. Bien que nos contrôles génétiques permettent de montrer que, malgré l'isolement, les modifications apportés aux neurones engendrent une augmentation de l'agressivité, il serait intéressant de voir si cet effet est conservé lorsque les mâles sont élevés en groupe ou s'il est amoindri ou annulé. Cela pourrait nous renseigner sur les facteurs environnementaux ou sociaux influençant l'activité des MBON-11 pour ainsi modulant les comportements agressifs. En l'occurrence ici, compte tenu de l'effet d'une exposition chronique au cVA, et donc à des conspécifiques mâles par extension, qui tend à réduire l'agressivité, j'aurai tendance à penser qu'activer les MBON-11 chez des drosophiles élevées en groupe engendrerait moins d'agressivité que lorsque les drosophiles sont élevées seules, et ce pour deux raisons. La première, c'est que nous n'observerions plus la potentialisation de

l'agressivité due à l'isolement social. La seconde, c'est que l'élevage en groupe pourrait réduire la sensibilité des mâles aux cVA, qui est une des phéromones engendrant de l'agressivité et qui, potentiellement, pourrait agir sur l'activité du MBON-11 lors des compétitions (Fernández & Kravitz, 2013; Liu et al., 2011).

Enfin, une dernière question que l'on pourrait se poser, compte tenu du lien étroit entre agressivité et reproduction et des hypothèses abordées jusqu'à présent, serait : *quid* de la reproduction ? L'activité de ces neurones modifient-ils la reproduction des mâles ? Cette question a déjà été abordée lors de précédents travaux au laboratoire : l'activation des MBON-11 chez les mâles n'engendre pas de diminution des comportements de cour ou des capacités reproductrices face à des femelles vierges (Bihl, non publié).

2.8. Les APL et DPM : des partenaires synaptiques des MBON-11

La question logique à l'issue de ce chapitre serait « Quels sont les neurones en aval des neurones MBON-11 pour réguler l'agressivité ? Existe-t-il une population de neurones dont l'activité déclenche inconditionnellement l'agression ? ». D'après les données de connectomiques disponibles à ce jour, les principaux inputs des MBON-11 proviennent des neurones DANs PPL1-01, des neurones DPM, des neurones glutamatergiques MBON-5 puis des neurones APL (site neuprint). De façon intéressante, les MBON-11 renvoient aussi des inputs aux PPL-01, DPM et APL.

Ainsi, les neurones APL GABAergiques, constituent l'un des principaux partenaires synaptiques en amont et en aval du MBON-11. Ces neurones permettent la discrimination des odeurs et l'association stimulus/valence, et connectent avec les DPM pour assurer des processus mnésiques (Mancini et al., 2023; Pitman et al., 2011; Saumweber et al., 2018; Zhou et al., 2019). En guise d'ouverture de ce projet, investiguer le rôle des APLs dans les comportements agressifs pourrait nous aider à expliquer l'hypothèse des valences biaisées. Pour cela, nous pourrions inhiber l'activité des APL avec sh^1s , compte tenu de la nature GABAergique des MBON-11, et voir si nous copions l'effet de l'activation des MBON-11. Si l'augmentation de l'agressivité est dû à l'inhibition des APL par les MBON-11, nous devrions alors observer cette même augmentation lorsque les APL sont inhibés.

Les DPM sont avant tout en amont des MBON-11, mais reçoivent également quelques projections du MBON-11. Ils sont connus pour permettre la formation de mémoire par des stimuli appétitifs et aversifs (Cervantes-Sandoval & Davis, 2012; Keene et al., 2006; Yu et al., 2005). Si l'hypothèse de la mémoire altérée comme mécanisme sous-jacent à l'augmentation de l'agressivité tendait à se confirmer, les DPM pourraient alors être des bons candidats à tester à la fois en tant que neurones impliqués dans les processus mnésiques et en tant que partenaire synaptique des MBON-11. Si l'activité des DPM est nécessaire pour créer une bonne trace mnésique des événements en cours, alors inhiber leur activité pourrait perturber l'établissement des effets gagnants et perdants.

3. La pertinence du passage de la drosophile à l'humain

Terminons cette discussion avec l'épineuse question de la pertinence de notre modèle vis-à-vis de l'humain. La passerelle n'est pas évidente lorsque l'on regarde les innombrables différences qui nous distinguent de cette petite mouche de quelques millimètres. Pourtant, la moitié de nos quelques 20 000 gènes trouvent un orthologue chez la drosophile. En ce qui concerne les gènes impliqués dans les pathologies, l'homologie grimpe à 60 voire 70% (Reiter et al., 2001). Cette forte homologie nous autorise, à faire des parallèles entre les conclusions issues de la drosophile et chez l'humain. A titre d'illustration, dans le cadre de l'agressivité, Edwards et collaborateurs ont identifié une quinzaine de gènes modulant l'agressivité de la drosophile, dont 8 ont des orthologues chez l'humain (Edwards et al., 2006). Ces gènes n'ont pas encore été étudiés dans le cadre de l'agressivité chez l'humain, et la plupart des travaux les concernant relèvent de l'oncologie (Fish et al., 2016; Ruenraroengsak et al., 2019; Shi et al., 2019). Ce type d'étude laisse présager d'une transposition possible, toute proportion gardée, des observations faites du comportement agressif chez la drosophile à l'humain.

Les comportements agressifs de la drosophile ont une certaine homologie avec l'agressivité humaine. Les deux espèces concourent à des ressources similaires (nourriture, territoire...), présentent une dynamique graduelle dans l'escalade de l'agressivité. Néanmoins, ces comportements diffèrent dans l'intensité qu'ils peuvent atteindre et sur les blessures physiques qu'ils peuvent engendrer. Dans de très rares cas, une drosophile peut blesser une autre en lui arrachant un bout d'ailes par exemple, notamment lors de comportement de maintien (*holding*). Les blessures ne vont pas au-delà, et ne sont jamais létales pour l'adversaire. Un humain en revanche, est tout à fait apte à infliger des blessures létales. Cela rajoute un degré de complexité

DISCUSSION GENERALE

supplémentaire au calcul bénéfice-risque chez l'humain qui est absente chez la drosophile. De plus, des différences physiologiques sont à noter : l'effet de la sérotonine par exemple qui est inversée entre les vertébrés et les invertébrés comme nous avons pu le mentionner.

Une ouverture de ce projet consisterait à qualifier plus en détails les caractéristiques du génotype MB112C/dTRPA1 dans l'optique d'en faire un modèle neurogénétique d'agressivité dérégulée voire d'hyperagressivité. L'avantage que ce modèle comparé aux lignées sélectionnées comme les lignées Bully, serait que nous nous affranchissons ici des modifications génétiques engendrés par la sélection (Chowdhury et al., 2017; Penn et al., 2010). Nous ciblons ici l'activité neuronale d'un individu à l'héritage génétique plus proche d'un génome « normal », du moins non sélectionné par le combat.

CONCLUSION ET IMPLICATIONS

Dans cette thèse, nous voulions répondre à la problématique générale qui interroge la régulation du comportement agressif et de ses conséquences pour l'adaptabilité des espèces. Quelles sont les facteurs individuels (expériences passées) et environnementaux (ressources à disposition) qui modulent l'agressivité et quels mécanismes neurobiologiques permettent une telle adaptation ? Pour répondre à ces questions, nous avons pris comme modèle *Drosophila melanogaster* en tant qu'animal capable d'émettre des comportements sociaux.

Ainsi, au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence : i) l'influence de victoires et défaites sur les comportements reproducteurs des mâles (chapitre 1), et ii) des mécanismes neuronaux et moléculaires intervenant dans la régulation des comportements agressifs (chapitre 2). Pour reprendre les questionnements de Tinbergen, nous avons mis en lumière de nouvelles causes de la dérégulation du comportement agressif, et les causes d'un comportement reproducteur déficitaire : la défaite à un combat précédent.

Nos travaux ouvrent la voie pour une étude plus approfondie de l'agressivité outrée voire de l'hyperagressivité d'un point de vue neuronal et comportemental et permet son étude en tant que tel. Jusqu'à présent, la plupart des travaux autour de l'agressivité dérégulée la considèrent comme symptôme à part entière, et ne cherchent pas à en comprendre ses implications. Or nous avons ici mis en évidence deux nouveaux acteurs neuronaux dans la régulation du comportement agressif : les VPM4 et MBON-11. De futures études pourront se baser sur la dérégulation comportementale induite par l'activation de ces neurones pour tenter de comprendre par quels mécanismes cette agressivité dérégulée est permise, mais également pour étudier plus en détails ce qu'implique les comportements agressifs dérégulés pour les individus en termes d'adaptabilité : provoquent-ils des conséquences aussi néfastes pour la reproduction des individus ? Sont-ils compensés par d'autres comportements ?

De plus, nous avons mis en évidence chez la drosophile l'importance du GLU au sein des VPM4 dans la régulation du comportement agressif des mâles drosophiles. Jusqu'à présent et à ma connaissance, peu d'études ont montré une implication glutamatergique aussi directe. Etudier plus en détails les autres neurones en aval des VPM4 de la même façon que nous avons étudié ici les MBON-11 pourraient révéler de nouveaux acteurs neuronaux et de nouvelles implications du glutamate dans la régulation de l'agressivité des drosophiles.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., ... Venter, J. C. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2185>
- Agrawal, P., Damian, K., Phuong, C., & Loren, L. L. (2020). The neuropeptide Drosulfakinin regulates social isolation-induced aggression in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology*, 223(5), 549-563. <https://doi.org/10.1037/bne0000089>
- Ahmed, O. M., Crocker, A., & Murthy, M. (2023). *Transcriptional profiling of Drosophila male-specific P1 (pC1) neurons*. <https://doi.org/10.1101/2023.11.07.566045>
- Aittoniemi, J., Jensen, M. Ø., Pan, A. C., & Shaw, D. E. (2023). Desensitization dynamics of the AMPA receptor. *Structure*, 31(6), 724-734.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2023.03.013>
- Alekseyenko, O. V., Chan, Y.-B., Fernandez, M. de la P., Bülow, T., Pankratz, M. J., & Kravitz, E. A. (2014). Single Serotonergic Neurons that Modulate Aggression in *Drosophila*. *Current Biology*, 24(22), 2700-2707. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.051>
- Alekseyenko, O. V., Chan, Y.-B., Li, R., & Kravitz, E. A. (2013). Single dopaminergic neurons that modulate aggression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 6151-6156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303446110>
- Alekseyenko, O. V., Chan, Y.-B., Okaty, B. W., Chang, Y., Dymecki, S. M., & Kravitz, E. A. (2019). Serotonergic Modulation of Aggression in *Drosophila* Involves GABAergic and Cholinergic Opposing Pathways. *Current Biology*, 29(13), 2145-2156.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.05.070>
- Alekseyenko, O. V., & Kravitz, E. A. (2014). Serotonin and the search for the anatomical substrate of aggression. *Fly*, 8(4), 200-205. <https://doi.org/10.1080/19336934.2015.1045171>
- Alekseyenko, O. V., Lee, C., & Kravitz, E. A. (2010). Targeted Manipulation of Serotonergic Neurotransmission Affects the Escalation of Aggression in Adult Male *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, 5(5), e10806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010806>
- Alivisatos, A. P., Chun, M., Church, G. M., Greenspan, R. J., Roukes, M. L., & Yuste, R. (2012). The Brain Activity Map Project and the Challenge of Functional Connectomics. *Neuron*, 74(6), 970-974. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.006>

BIBLIOGRAPHIE

- Amin, H., Apostolopoulou, A. A., Suárez-Grimalt, R., Vrontou, E., & Lin, A. C. (2020). Localized inhibition in the *Drosophila* mushroom body. *eLife*, 9, e56954. <https://doi.org/10.7554/eLife.56954>
- Amin, H., Nolte, S. S., Swain, B., & Von Philipsborn, A. C. (2023). GABAergic signaling shapes multiple aspects of *Drosophila* courtship motor behavior. *iScience*, 26(11), 108069. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.108069>
- Amino, K., & Matsuo, T. (2023). Effects of a past contest on the future winning probability in a hyper-aggressive fruit fly. *Behavioural Processes*, 206. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2023.104831>
- Andrews, J. C., Fernández, M. P., Yu, Q., Leary, G. P., Leung, A. K. W., Kavanaugh, M. P., Kravitz, E. A., & Certel, S. J. (2014). Octopamine Neuromodulation Regulates Gr32a-Linked Aggression and Courtship Pathways in *Drosophila* Males. *PLoS Genetics*, 10(5), e1004356. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004356>
- Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2012). Genetics of Aggression. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 145-164. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155514>
- Antony, C., Davis, T. L., Carlson, D. A., Pechine, J. M., & Jallon, J. M. (1985). Compared behavioral responses of male *Drosophila melanogaster* (Canton S) to natural and synthetic aphrodisiacs. *Journal of Chemical Ecology*, 11(12), 1617-1629. <https://doi.org/10.1007/BF01012116>
- Antony, C., & Jallon, J.-M. (1982). The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, 28(10), 873-880. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90101-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90101-9)
- Apfelbach, R., Blanchard, C. D., Blanchard, R. J., Hayes, R. A., & McGregor, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species : A review of field and laboratory studies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1123-1144. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.05.005>
- Aristote. (343apr. J.-C.). *Περὶ τὰ ζῷα ἰστορίαι*.
- Arthur, B. I., Jallon, J. M., Caflisch, B., Choffat, Y., & Nöthiger, R. (1998). Sexual behaviour in *Drosophila* is irreversibly programmed during a critical period. *Current Biology: CB*, 8(21), 1187-1190. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(07\)00491-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(07)00491-5)

BIBLIOGRAPHIE

- Asahina, K. (2017). Neuromodulation and Strategic Action Choice in *Drosophila* Aggression. *Annual Review of Neuroscience*, 40(1), 51-75. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031240>
- Asahina, K., Watanabe, K., Duistermars, B. J., Hoopfer, E., González, C. R., Eyjólfsson, E. A., Perona, P., & Anderson, D. J. (2014). Tachykinin-Expressing Neurons Control Male-Specific Aggressive Arousal in *Drosophila*. *Cell*, 156(1-2), 221-235. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.045>
- Aso, Y., Hattori, D., Yu, Y., Johnston, R. M., Iyer, N. A., Ngo, T.-T., Dionne, H., Abbott, L., Axel, R., Tanimoto, H., & Rubin, G. M. (2014). The neuronal architecture of the mushroom body provides a logic for associative learning. *eLife*, 3, e04577. <https://doi.org/10.7554/eLife.04577>
- Aso, Y., Ray, R. P., Long, X., Bushey, D., Cichewicz, K., Ngo, T.-T., Sharp, B., Christoforou, C., Hu, A., Lemire, A. L., Tillberg, P., Hirsh, J., Litwin-Kumar, A., & Rubin, G. M. (2019). Nitric oxide acts as a cotransmitter in a subset of dopaminergic neurons to diversify memory dynamics. *eLife*, 8, e49257. <https://doi.org/10.7554/eLife.49257>
- Aso, Y., Sitaraman, D., Ichinose, T., Kaun, K. R., Vogt, K., Belliard-Guérin, G., Plaçais, P.-Y., Robie, A. A., Yamagata, N., Schnaitmann, C., Rowell, W. J., Johnston, R. M., Ngo, T.-T. B., Chen, N., Korff, W., Nitabach, M. N., Heberlein, U., Preat, T., Branson, K. M., ... Rubin, G. M. (2014). Mushroom body output neurons encode valence and guide memory-based action selection in *Drosophila*. *eLife*, 3, e04580. <https://doi.org/10.7554/eLife.04580>
- Baenninger, R. (1974). Some consequences of aggressive behavior : A selective review of the literature on other animals. *Aggressive Behavior*, 1(1), 17-37. [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1974\)1:1<17::AID-AB2480010104>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1974)1:1<17::AID-AB2480010104>3.0.CO;2-Y)
- Baier, A., Wittek, B., & Brembs, B. (2002). *Neurobiology of aggression in Drosophila*. 8.
- Baker, C. A., Clemens, J., & Murthy, M. (2019). Acoustic Pattern Recognition and Courtship Songs : Insights from Insects. *Annual Review of Neuroscience*, 42(1), 129-147. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-061839>
- Barrio, C., Arias-Sánchez, S., & Martín-Monzón, I. (2022). The gut microbiota-brain axis, psychobiotics and its influence on brain and behaviour: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology*, 137, 105640. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105640>

BIBLIOGRAPHIE

- Bartholow, B. D. (2018). The aggressive brain : Insights from neuroscience. *Current Opinion in Psychology*, 19, 60-64. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.002>
- Bath, E., Edmunds, D., Norman, J., Atkins, C., Harper, L., Rostant, W. G., Chapman, T., Wigby, S., & Perry, J. C. (2021). Sex ratio and the evolution of aggression in fruit flies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1947), rspb.2020.3053, 20203053. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.3053>
- Beiderbeck, D. I., Reber, S. O., Havasi, A., Bredewold, R., Veenema, A. H., & Neumann, I. D. (2012). High and abnormal forms of aggression in rats with extremes in trait anxiety – Involvement of the dopamine system in the nucleus accumbens. *Psychoneuroendocrinology*, 37(12), 1969-1980. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.04.011>
- Beilharz, R. G., & Beilharz, V. C. (1975). Observations on Fighting Behaviour of Male Mice (*Mus musculus* L.). *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, 39(1-5), 126-140. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1975.tb00903.x>
- Belenioti, M., & Chaniotakis, N. (2020). Aggressive Behaviour of *Drosophila suzukii* in Relation to Environmental and Social Factors. *Scientific Reports*, 10(1), 7898. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64941-1>
- Bergan, J. F. (2015). Neural Computation and Neuromodulation Underlying Social Behavior. *Integrative and Comparative Biology*, 55(2), 268-280. <https://doi.org/10.1093/icb/icv061>
- Berglund, A., Bisazza, A., & Pilastro, A. (1996). Armaments and ornaments : An evolutionary explanation of traits of dual utility. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(4), 385-399. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1996.tb01442.x>
- Billeter, J.-C., & Levine, J. D. (2015). The role of cVA and the Odorant binding protein Lush in social and sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3. <https://doi.org/10.3389/fevo.2015.00075>
- Blanchard, D. C., Griebel, G., Pobbe, R., & Blanchard, R. J. (2011). Risk assessment as an evolved threat detection and analysis process. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(4), 991-998. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.016>
- Blanchard, R. J., Magee, L., Veniegas, R., & Blanchard, D. C. (1993). *Alcohol and anxiety : Ethopharmacological approaches.*

BIBLIOGRAPHIE

- Blanchard, R. J., McKittrick, C. R., & Blanchard, D. C. (2001). Animal models of social stress : Effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology & Behavior*, 73(3), 261-271. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00449-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00449-8)
- Bowyer, R. T., McCullough, D. R., Rachlow, J. L., Ciuti, S., & Whiting, J. C. (2020). Evolution of ungulate mating systems: Integrating social and environmental factors. *Ecology and Evolution*, 10(11), 5160-5178. <https://doi.org/10.1002/ece3.6246>
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, 118(2), 401-415. <https://doi.org/10.1242/dev.118.2.401>
- Bridgman, T., Cummings, S., & Ballard, J. (2019). Who Built Maslow's Pyramid? A History of the Creation of Management Studies' Most Famous Symbol and Its Implications for Management Education. *Academy of Management Learning & Education*, 18(1), 81-98. <https://doi.org/10.5465/amle.2017.0351>
- Briffa, M. (2010). Territoriality and Aggression. *Nature Education Knowledge*, 3(10).
- Bubak, A. N., Watt, M. J., Yaeger, J. D. W., Renner, K. J., & Swallow, J. G. (2020). The stalk-eyed fly as a model for aggression – is there a conserved role for 5-HT between vertebrates and invertebrates? *Journal of Experimental Biology*, 223(1), jeb132159. <https://doi.org/10.1242/jeb.132159>
- Buhmann, J., Sheridan, A., Gerhard, S., Krause, R., Nguyen, T., Heinrich, L., Schlegel, P., Lee, W.-C. A., Wilson, R., Saalfeld, S., Jefferis, G., Bock, D., Turaga, S., Cook, M., & Funke, J. (2019). *Automatic Detection of Synaptic Partners in a Whole-Brain Drosophila EM Dataset*. <https://doi.org/10.1101/2019.12.12.874172>
- Burke, C. J., Huetteroth, W., Oswald, D., Perisse, E., Krashes, M. J., Das, G., Gohl, D., Silies, M., Certel, S., & Waddell, S. (2012). Layered reward signalling through octopamine and dopamine in Drosophila. *Nature*, 492(7429), 433-437. <https://doi.org/10.1038/nature11614>
- Burnett, C. J., Funderburk, S. C., Navarrete, J., Sabol, A., Liang-Guallpa, J., Desrochers, T. M., & Krashes, M. J. (2019). Need-based prioritization of behavior. *eLife*, 8, e44527. <https://doi.org/10.7554/eLife.44527>

BIBLIOGRAPHIE

- Busch, S., Selcho, M., Ito, K., & Tanimoto, H. (2009). A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain. *The Journal of Comparative Neurology*, *513*(6), 643-667. <https://doi.org/10.1002/cne.21966>
- Butterworth, F. M. (1969). Lipids of *Drosophila* : A newly detected lipid in the male. *Science (New York, N.Y.)*, *163*(3873), 1356-1357. <https://doi.org/10.1126/science.163.3873.1356>
- Buwalda, B., Koolhaas, J. M., & De Boer, S. F. (2017). Trait aggressiveness does not predict social dominance of rats in the Visible Burrow System. *Physiology & Behavior*, *178*, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.008>
- Camerlink, I., Turner, S. P., Farish, M., & Arnott, G. (2017). The influence of experience on contest assessment strategies. *Scientific Reports*, *7*(1), 14492. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15144-8>
- Caygill, E. E., & Brand, A. H. (2016). The GAL4 System : A Versatile System for the Manipulation and Analysis of Gene Expression. In C. Dahmann (Éd.), *Drosophila* (Vol. 1478, p. 33-52). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6371-3_2
- Certel, S. J., Leung, A., Lin, C.-Y., Perez, P., Chiang, A.-S., & Kravitz, E. A. (2010). Octopamine Neuromodulatory Effects on a Social Behavior Decision-Making Network in *Drosophila* Males. *PLoS ONE*, *5*(10), e13248. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013248>
- Certel, S. J., Savella, M. G., Schlegel, D. C. F., & Kravitz, E. A. (2007). Modulation of *Drosophila* male behavioral choice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(11), 4706-4711. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700328104>
- Cervantes-Sandoval, I., & Davis, R. L. (2012). Distinct traces for appetitive versus aversive olfactory memories in DPM neurons of *Drosophila*. *Current Biology: CB*, *22*(13), 1247-1252. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.009>
- Chan, J. P. Y., Lau, P. R., Tham, A. J., & Li, D. (2008). The effects of male–male contests and female eavesdropping on female mate choice and male mating success in the jumping spider, *Thiania bhamoensis* (Araneae : Salticidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *62*(5), 639-646. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0488-x>
- Chan, Y.-B., & Kravitz, E. A. (2007). Specific subgroups of Fru^M neurons control sexually dimorphic patterns of aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(49), 19577-19582. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709803104>

BIBLIOGRAPHIE

- Chang, H.-Y., Grygoruk, A., Brooks, E. S., Ackerson, L. C., Maidment, N. T., Bainton, R. J., & Krantz, D. E. (2006). Overexpression of the *Drosophila* vesicular monoamine transporter increases motor activity and courtship but decreases the behavioral response to cocaine. *Molecular Psychiatry*, *11*(1), 99-113. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001742>
- Chen, S., Lee, A. Y., Bowens, N. M., Huber, R., & Kravitz, E. A. (2002). Fighting fruit flies : A model system for the study of aggression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(8), 5664-5668. <https://doi.org/10.1073/pnas.082102599>
- Chouhan, N. S., Mohan, K., & Ghose, A. (2017). cAMP signaling mediates behavioral flexibility and consolidation of social status in *Drosophila* aggression. *Journal of Experimental Biology*, jeb.165811. <https://doi.org/10.1242/jeb.165811>
- Chowdhury, B., Chan, Y.-B., & Kravitz, E. A. (2017). Putative transmembrane transporter modulates higher-level aggression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(9), 2373-2378. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618354114>
- Chowdhury, B., Wang, M., Gnerer, J. P., & Dierick, H. A. (2021). The Divider Assay is a high-throughput pipeline for aggression analysis in *Drosophila*. *Communications Biology*, *4*(1), 85. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01617-6>
- Choy, O. (2023). Nutritional factors associated with aggression. *Frontiers in Psychiatry*, *14*, 1176061. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1176061>
- Churchill, E. R., Bridle, J. R., & Thom, M. D. F. (2020). Spatially clustered resources increase male aggregation and mating duration in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, *169*, 45-50. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.09.002>
- Clowney, E. J., Iguchi, S., Bussell, J. J., Scheer, E., & Ruta, V. (2015). Multimodal Chemosensory Circuits Controlling Male Courtship in *Drosophila*. *Neuron*, *87*(5), 1036-1049. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.025>
- Clutton-Brock, T. (2007). Sexual selection in males and females. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5858), 1882-1885. <https://doi.org/10.1126/science.1133311>
- Cooper, J. E. (2011). Anesthesia, Analgesia, and Euthanasia of Invertebrates. *ILAR Journal*, *52*(2), 196-204. <https://doi.org/10.1093/ilar.52.2.196>
- Court, R., Costa, M., Pilgrim, C., Millburn, G., Holmes, A., McLachlan, A., Larkin, A., Matentzoglou, N., Kir, H., Parkinson, H., Brown, N. H., O'Kane, C. J., Armstrong, J. D., Jefferis,

BIBLIOGRAPHIE

- G. S. X. E., & Osumi-Sutherland, D. (2023). Virtual Fly Brain—An interactive atlas of the *Drosophila* nervous system. *Frontiers in Physiology*, *14*, 1076533. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1076533>
- Crickmore, M. A., & Vosshall, L. B. (2013). Opposing dopaminergic and GABAergic neurons control the duration and persistence of copulation in *Drosophila*. *Cell*, *155*(4), 881-893. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.055>
- Dana, H., Sun, Y., Mohar, B., Hulse, B. K., Kerlin, A. M., Hasseman, J. P., Tsegaye, G., Tsang, A., Wong, A., Patel, R., Macklin, J. J., Chen, Y., Konnerth, A., Jayaraman, V., Looger, L. L., Schreiter, E. R., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2019). High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nature Methods*, *16*(7), 649-657. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0435-6>
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology*, *65*(1), 1-105. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(00\)00067-8](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(00)00067-8)
- Danchin, E., Nöbel, S., Pocheville, A., Dagaëff, A.-C., Demay, L., Alphand, M., Ranty-Roby, S., Van Renssen, L., Monier, M., Gazagne, E., Allain, M., & Isabel, G. (2018). Cultural flies : Conformist social learning in fruitflies predicts long-lasting mate-choice traditions. *Science*, *362*(6418), 1025-1030. <https://doi.org/10.1126/science.aat1590>
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*.
- Davis, R. L. (2023). Learning and memory using *Drosophila melanogaster* : A focus on advances made in the fifth decade of research. *Genetics*, *224*(4), iyad085. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad085>
- Day, J. (2016). Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*, *7*(4), 65. <https://doi.org/10.3390/insects7040065>
- De Almeida, R. M. M., Ferrari, P. F., Parmigiani, S., & Miczek, K. A. (2005). Escalated aggressive behavior : Dopamine, serotonin and GABA. *European Journal of Pharmacology*, *526*(1-3), 51-64. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.10.004>
- De Boer, S. F. (2018). Animal models of excessive aggression : Implications for human aggression and violence. *Current Opinion in Psychology*, *19*, 81-87. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2017.04.006>

BIBLIOGRAPHIE

- de Boer, S. F. (2016). *Untangling the neurobiology of escalated aggression in animals*. 57-72. <http://www.csf2016.com/index.php>
- Del Matto, L., De Macedo Rego, R., & Santos, E. (2021). *Mate-guarding duration is mainly influenced by the risk of sperm competition and not by female quality in a golden orb-weaver spider*. <https://doi.org/10.32942/OSF.IO/2U8TC>
- Delescluse, J. (2024). *MND, un transporteur d'acides aminés, acteur clef de la réponse aux acides aminés des corps pédonculés chez Drosophila melanogaster*. [Thèse de Doctorat]. Université de Bourgogne.
- Dembeck, L. M., Böröczky, K., Huang, W., Schal, C., Anholt, R. R. H., & Mackay, T. F. C. (2015). Genetic architecture of natural variation in cuticular hydrocarbon composition in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, 4, e09861. <https://doi.org/10.7554/eLife.09861>
- Deutsch, D., Clemens, J., Thiberge, S. Y., Guan, G., & Murthy, M. (2019). Shared Song Detector Neurons in *Drosophila* Male and Female Brains Drive Sex-Specific Behaviors. *Current Biology: CB*, 29(19), 3200-3215.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.008>
- Díaz, J. L. (2010). The psychobiology of aggression and violence : Bioethical implications: Bioethical implications of aggression and violence. *International Social Science Journal*, 61(200-201), 233-245. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2451.2011.01760.x>
- Dierick, H. A., & Greenspan, R. J. (2006). Molecular analysis of flies selected for aggressive behavior. *Nature Genetics*, 38(9), 1023-1031. <https://doi.org/10.1038/ng1864>
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblauer, S., Couto, A., Marra, V., Keleman, K., & Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, 448(7150), 151-156. <https://doi.org/10.1038/nature05954>
- Dindo, M. L., & Nakamura, S. (2018). Oviposition Strategies of Tachinid Parasitoids : Two *Exorista* Species as Case Studies. *International Journal of Insect Science*, 10, 117954331875749. <https://doi.org/10.1177/1179543318757491>
- D'Occhio, M. J., Ghuman, S. S., Neglia, G., Della Valle, G., Baruselli, P. S., Zicarelli, L., Visintin, J. A., Sarkar, M., & Campanile, G. (2020). Exogenous and endogenous factors in seasonality of reproduction in buffalo : A review. *Theriogenology*, 150, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.044>

BIBLIOGRAPHIE

- Dorkenwald, S., Matsliah, A., Sterling, A. R., Schlegel, P., Yu, S., McKellar, C. E., Lin, A., Costa, M., Eichler, K., Yin, Y., Silversmith, W., Schneider-Mizell, C., Jordan, C. S., Brittain, D., Halageri, A., Kuehner, K., Ogedengbe, O., Morey, R., Gager, J., ... the FlyWire Consortium. (2023). *Neuronal wiring diagram of an adult brain*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546656>
- Dow, M. A., & Schilcher, F. V. (1975). Aggression and mating success in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, *254*(5500), 511-512. <https://doi.org/10.1038/254511a0>
- Drews, C. (1993). The Concept and Definition of Dominance in Animal Behaviour. *Behaviour*, *125*(3-4), 283-313. <https://doi-org.insb.bib.cnrs.fr/10.1163/156853993X00290>
- Drosophila melanogaster*. (2024). In *Wikipédia*. https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Drosophila_melanogaster&oldid=214349757
- Dugatkin, L. A. (1992). Sexual Selection and Imitation : Females Copy the Mate Choice of Others. *The American Naturalist*, *139*(6), 1384-1389. <https://doi.org/10.1086/285392>
- Dvořáček, J., & Kodrík, D. (2021). *Drosophila* reward system—A summary of current knowledge. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *123*, 301-319. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.12.032>
- Eaton, L., Edmonds, E. J., Henry, T. B., Snellgrove, D. L., & Sloman, K. A. (2015). Mild maternal stress disrupts associative learning and increases aggression in offspring. *Hormones and Behavior*, *71*, 10-15. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.03.005>
- Edmunds, D., Wigby, S., & Perry, J. C. (2021). ‘Hangry’ *Drosophila* : Food deprivation increases male aggression. *Animal Behaviour*, *177*, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2021.05.001>
- Edwards, A. C., Ayroles, J. F., Stone, E. A., Carbone, M., Lyman, R. F., & Mackay, T. F. (2009). A transcriptional network associated with natural variation in *Drosophila* aggressive behavior. *Genome Biology*, *10*(7), R76. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-7-r76>
- Edwards, A. C., Rollmann, S. M., Morgan, T. J., & Mackay, T. F. C. (2006). Quantitative Genomics of Aggressive Behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, *2*(9), e154. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020154>
- Edwards, R. H. (2007). The Neurotransmitter Cycle and Quantal Size. *Neuron*, *55*(6), 835-858. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.001>

BIBLIOGRAPHIE

- Eibl-Eibesfeldt, L. (1977). Evolution of Destructive Aggression. *Aggressive Behavior*, 3(2), 127-144. [https://doi.org/10.1002/1098-2337\(1977\)3:2<127::AID-AB2480030204>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1098-2337(1977)3:2<127::AID-AB2480030204>3.0.CO;2-Y)
- El Mestikawy, S., Wallén-Mackenzie, Å., Fortin, G. M., Descarries, L., & Trudeau, L.-E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: Vesicular glutamate transporters. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(4), 204-216. <https://doi.org/10.1038/nrn2969>
- Fahrbach, S. E. (2006). STRUCTURE OF THE MUSHROOM BODIES OF THE INSECT BRAIN. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 209-232. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150954>
- 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), e40396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040396>
- Fernández, M. D. L. P., Chan, Y.-B., Yew, J. Y., Billeter, J.-C., Dreisewerd, K., Levine, J. D., & Kravitz, E. A. (2010). Pheromonal and Behavioral Cues Trigger Male-to-Female Aggression in *Drosophila*. *PLoS Biology*, 8(11), e1000541. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000541>
- Fernández, M. P., & Kravitz, E. A. (2013). Aggression and courtship in *Drosophila*: Pheromonal communication and sex recognition. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 199(11), 1065-1076. <https://doi.org/10.1007/s00359-013-0851-5>
- Ferrari, P. F., Van Erp, A. M. M., Tornatzky, W., & Miczek, K. A. (2003). Accumbal dopamine and serotonin in anticipation of the next aggressive episode in rats. *European Journal of Neuroscience*, 17(2), 371-378. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02447.x>
- Ferveur, J. F., & Sureau, G. (1996). Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster*. *Proceedings. Biological Sciences*, 263(1373), 967-973. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0143>
- Field, M., Dorovykh, V., Thomas, P., & Smart, T. G. (2021). Physiological role for GABAA receptor desensitization in the induction of long-term potentiation at inhibitory synapses. *Nature Communications*, 12(1), 2112. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22420-9>

BIBLIOGRAPHIE

- Filice, D. C. S., & Dukas, R. (2019). Winners have higher pre-copulatory mating success but losers have better post-copulatory outcomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1900), 20182838. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2838>
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Fish, L., Pencheva, N., Goodarzi, H., Tran, H., Yoshida, M., & Tavazoie, S. F. (2016). Muscleblind-like 1 suppresses breast cancer metastatic colonization and stabilizes metastasis suppressor transcripts. *Genes & Development*, 30(4), 386-398. <https://doi.org/10.1101/gad.270645.115>
- Fonberg, E. (1988). Dominance and Aggression. *International Journal of Neuroscience*, 41(3-4), 201-213. <https://doi.org/10.3109/00207458808990726>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An {R} Companion to Applied Regression* [Logiciel]. Third Edition. Thousand Oaks CA: Sage. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Freeberg, T. M. (2004). Social transmission of courtship behavior and mating preferences in brown-headed cowbirds, *Molothrus ater*. *Animal Learning & Behavior*, 32(1), 122-130. <https://doi.org/10.3758/BF03196013>
- Friard, O., & Gamba, M. (2016). BORIS : a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1325-1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Ganguly, I., Heckman, E. L., Litwin-Kumar, A., Clowney, E. J., & Behnia, R. (2023). Diversity of visual inputs to Kenyon cells of the *Drosophila* mushroom body. *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, 2023.10.12.561793. <https://doi.org/10.1101/2023.10.12.561793>
- Gaskett, A. C. (2007). Spider sex pheromones : Emission, reception, structures, and functions. *Biological Reviews*, 82(1), 27-48. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2006.00002.x>
- Georgiev, A. V., Klimczuk, A. C. E., Traficante, D. M., & Maestripieri, D. (2013). When Violence Pays : A Cost-Benefit Analysis of Aggressive Behavior in Animals and Humans. *Evolutionary Psychology*, 11(3), 678-699. <https://doi.org/10.1177/147470491301100313>
- Gielen, M., Thomas, P., & Smart, T. G. (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nature Communications*, 6(1), 6829. <https://doi.org/10.1038/ncomms7829>

BIBLIOGRAPHIE

- Gilley, D. C. (2001). The Behavior of Honey Bees (*Apis mellifera ligustica*) during Queen Duels. *Ethology*, *107*(7), 601-622. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2001.00692.x>
- Giurfa, M. (2003). The amazing mini-brain : Lessons from a honey bee. *Bee World*, *84*(1), 5-18. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2003.11099566>
- Gór, Á., Lang, Z., Pásztor, K., Szigeti, V., Vajna, F., & Kis, J. (2023). Mate-guarding success depends on male investment in a butterfly. *Ecology and Evolution*, *13*(9), e10533. <https://doi.org/10.1002/ece3.10533>
- Greenspan, R. J., & Ferveur, J.-F. (2000). *COURTSHIP IN DROSOPHILA*.
- Grether, G. F., Anderson, C. N., Drury, J. P., Kirschel, A. N. G., Losin, N., Okamoto, K., & Peiman, K. S. (2013). The evolutionary consequences of interspecific aggression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1289*(1), 48-68. <https://doi.org/10.1111/nyas.12082>
- Grigliatti, T. A., Hall, L., Rosenbluth, R., & Suzuki, D. T. (1973). Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. XIV. A selection of immobile adults. *Molecular & General Genetics: MGG*, *120*(2), 107-114. <https://doi.org/10.1007/BF00267238>
- Grinberg, M., Levin, R., Neuman, H., Ziv, O., Turjeman, S., Gamliel, G., Nosenko, R., & Koren, O. (2022). Antibiotics increase aggression behavior and aggression-related pheromones and receptors in *Drosophila melanogaster*. *iScience*, *25*(6), 104371. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104371>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature10428>
- Guven-Ozkan, T., & Davis, R. L. (2014). Functional neuroanatomy of *Drosophila* olfactory memory formation. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *21*(10), 519-526. <https://doi.org/10.1101/lm.034363.114>
- Ha, T. S., & Smith, D. P. (2006). A Pheromone Receptor Mediates 11- *cis* -Vaccenyl Acetate-Induced Responses in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, *26*(34), 8727-8733. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0876-06.2006>
- Haagensen, A. M. J., Sørensen, D. B., Sandøe, P., Matthews, L. R., Birck, M. M., Fels, J. J., & Astrup, A. (2014). High Fat, Low Carbohydrate Diet Limit Fear and Aggression in Göttingen Minipigs. *PLoS ONE*, *9*(4), e93821. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093821>

BIBLIOGRAPHIE

- Halász, J., Tóth, M., Kalló, I., Liposits, Z., & Haller, J. (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression—A double labeling study. *Behavioural Brain Research*, *175*(1), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.019>
- Haller, J., Harold, G., Sandi, C., & Neumann, I. D. (2014). Effects of Adverse Early-Life Events on Aggression and Anti-Social Behaviours in Animals and Humans. *Journal of Neuroendocrinology*, *26*(10), 724-738. <https://doi.org/10.1111/jne.12182>
- Halperin, J. R. P., Giri, T., Elliott, J., & Dunham, D. W. (1998). Consequences of hyper-aggressiveness in Siamese fighting fish : Cheaters seldom prospered. *Animal Behaviour*, *55*(1), 87-96. <https://doi.org/10.1006/anbe.1997.0585>
- Halpern, M. E., Rhee, J., Goll, M. G., Akitake, C. M., Parsons, M., & Leach, S. D. (2008). Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish*, *5*(2), 97-110. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0530>
- Hamada, F. N., Rosenzweig, M., Kang, K., Pulver, S. R., Ghezzi, A., Jegla, T. J., & Garrity, P. A. (2008). An internal thermal sensor controlling temperature preference in Drosophila. *Nature*, *454*(7201), 217-220. <https://doi.org/10.1038/nature07001>
- Hamilton, W. D. (1979). WINGLESS AND FIGHTING MALES IN FIG WASPS AND OTHER INSECTS. In *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects* (p. 167-220). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-108750-0.50011-2>
- Hancock, C. E., Rostami, V., Rachad, E. Y., Deimel, S. H., Nawrot, M. P., & Fiala, A. (2022). Visualization of learning-induced synaptic plasticity in output neurons of the Drosophila mushroom body γ -lobe. *Scientific Reports*, *12*(1), 10421. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14413-5>
- Harts, A. M. F., Booksmythe, I., & Jennions, M. D. (2016). Mate guarding and frequent copulation in birds : A meta-analysis of their relationship to paternity and male phenotype: PATERNITY PROTECTION IN BIRDS. *Evolution*, *70*(12), 2789-2808. <https://doi.org/10.1111/evo.13081>
- Heinrich, L., Funke, J., Pape, C., Nunez-Iglesias, J., & Saalfeld, S. (2018). *Synaptic Cleft Segmentation in Non-Isotropic Volume Electron Microscopy of the Complete Drosophila Brain* (arXiv:1805.02718). arXiv. <http://arxiv.org/abs/1805.02718>

BIBLIOGRAPHIE

- Henderson, V. (1994). *La nature des soins infirmiers*. <https://www.decitre.fr/livres/la-nature-des-soins-infirmiers-9782729605032.html>
- Hidoh, O., & Fukami, J. (1987). Presynaptic modulation by octopamine at a single neuromuscular junction in the mealworm (*Tenebrio molitor*). *Journal of Neurobiology*, *18*(3), 315-326. <https://doi.org/10.1002/neu.480180306>
- Hobson, E. A., Mønster, D., & DeDeo, S. (2021). Aggression heuristics underlie animal dominance hierarchies and provide evidence of group-level social information. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(10), e2022912118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022912118>
- Hoffmann, A. A. (1987). A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Animal Behaviour*, *35*(3), 807-818. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(87\)80117-3](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(87)80117-3)
- Hoffmann, A. A. (1990). The influence of age and experience with conspecifics on territorial behavior in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Behavior*, *3*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1007/BF01049191>
- Hoffmann, A. A., & Cacoyianni, Z. (1989). Selection for territoriality in *Drosophila melanogaster*: Correlated responses in mating success and other fitness components. *Animal Behaviour*, *38*(1), 23-34. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(89\)80062-4](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(89)80062-4)
- Hoffmann, A. A., & Cacoyianni, Z. (1990). Territoriality in *Drosophila melanogaster* as a conditional strategy. *Animal Behaviour*, *40*(3), 526-537. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(05\)80533-0](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(05)80533-0)
- Hoopfer, E. D., Jung, Y., Inagaki, H. K., Rubin, G. M., & Anderson, D. J. (2015). *PI interneurons promote a persistent internal state that enhances inter-male aggression in Drosophila*. *27*.
- Hosseini, S. A., Van Wijk, M., Ke, G., Goldansaz, S. H., Schal, C., & Groot, A. T. (2016). Experimental evidence for chemical mate guarding in a moth. *Scientific Reports*, *6*(1), 38567. <https://doi.org/10.1038/srep38567>
- Hoyer, S. C., Eckart, A., Herrel, A., Zars, T., Fischer, S. A., Hardie, S. L., & Heisenberg, M. (2008). Octopamine in Male Aggression of *Drosophila*. *Current Biology*, *18*(3), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.052>

BIBLIOGRAPHIE

- Hsu, Y., Earley, R. L., & Wolf, L. L. (2005). Modulation of aggressive behaviour by fighting experience: Mechanisms and contest outcomes. *Biological Reviews*, 81(01), 33-74. <https://doi.org/10.1017/S146479310500686X>
- Hu, S. W., Yang, Y. T., Sun, Y., Zhan, Y. P., & Zhu, Y. (2020). Serotonin Signals Overcome Loser Mentality in *Drosophila*. *iScience*, 23(11), 101651. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101651>
- Huxley, J. S. (1966). Introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 251(772), 249-271. <https://doi.org/10.1098/rstb.1966.0010>
- Ichinose, T., Kanno, M., Wu, H., Yamagata, N., Sun, H., Abe, A., & Tanimoto, H. (2021). Mushroom body output differentiates memory processes and distinct memory-guided behaviors. *Current Biology*, 31(6), 1294-1302.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.12.032>
- Ichinose, T., Tanimoto, H., & Yamagata, N. (2017). Behavioral Modulation by Spontaneous Activity of Dopamine Neurons. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 11, 88. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2017.00088>
- Ishimoto, H., & Kamikouchi, A. (2020). A Feedforward Circuit Regulates Action Selection of Pre-mating Courtship Behavior in Female *Drosophila*. *Current Biology*, 30(3), 396-407.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.11.065>
- Izant, J. G., & Weintraub, H. (1984). Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell*, 36(4), 1007-1015. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90050-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90050-3)
- Jia, J., He, L., Yang, J., Shuai, Y., Yang, J., Wu, Y., Liu, X., Chen, T., Wang, G., Wang, X., Song, X., Ding, Z., Zhu, Y., Zhang, L., Chen, P., & Qin, H. (2021). A pair of dopamine neurons mediate chronic stress signals to induce learning deficit in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(42), e2023674118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023674118>
- Johnson, O., Becnel, J., & Nichols, C. D. (2009). Serotonin 5-HT₂ and 5-HT_{1A}-like receptors differentially modulate aggressive behaviors in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience*, 158(4), 1292-1300. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.10.055>
- Johnstone, R. A. (2001). Eavesdropping and animal conflict. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 9177-9180. <https://doi.org/10.1073/pnas.161058798>

BIBLIOGRAPHIE

- Jones, L. J., & Norton, W. H. J. (2015). Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. *Behavioural Brain Research*, 276, 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.055>
- Jung, Y., Kennedy, A., Chiu, H., Mohammad, F., Claridge-Chang, A., & Anderson, D. J. (2020). Neurons that Function within an Integrator to Promote a Persistent Behavioral State in *Drosophila*. *Neuron*, 105(2), 322-333.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.10.028>
- Kabra, M., Robie, A. A., Rivera-Alba, M., Branson, S., & Branson, K. (2013). JAABA : Interactive machine learning for automatic annotation of animal behavior. *Nature Methods*, 10(1), 64-67. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2281>
- Karino, K., & Someya, C. (2007). The influence of sex, line, and fight experience on aggressiveness of the Siamese fighting fish in intrasexual competition. *Behavioural Processes*, 75(3), 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2007.03.002>
- Kárpáti, Z., Deutsch, F., Kiss, B., & Schmitt, T. (2023). Seasonal changes in photoperiod and temperature lead to changes in cuticular hydrocarbon profiles and affect mating success in *Drosophila suzukii*. *Scientific Reports*, 13(1), 5649. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32652-y>
- Kavaliers, M., & Choleris, E. (2017). Social Cognition and the Neurobiology of Rodent Mate Choice. *Integrative and Comparative Biology*, 57(4), 846-856. <https://doi.org/10.1093/icb/ix042>
- Kavaliers, M., Matta, R., & Choleris, E. (2017). Mate-choice copying, social information processing, and the roles of oxytocin. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 72, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.12.003>
- Kawanabe, S., Mori, M., Harada, H., Murata, Y., Ohe, K., & Enjoji, M. (2023). Upregulations of $\alpha 1$ adrenergic receptors and noradrenaline synthases in the medial prefrontal cortex are associated with emotional and cognitive dysregulation induced by post-weaning social isolation in male rats. *Neuroscience Letters*, 797, 137071. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137071>
- Keene, A. C., Krashes, M. J., Leung, B., Bernard, J. A., & Waddell, S. (2006). *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Current Biology: CB*, 16(15), 1524-1530. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.022>

BIBLIOGRAPHIE

- Keller, M. (2017). Feeding live invertebrate prey in zoos and aquaria : Are there welfare concerns? *Zoo Biology*, 36(5), 316-322. <https://doi.org/10.1002/zoo.21378>
- Kenyon, F. C. (1896). The brain of the bee. A preliminary contribution to the morphology of the nervous system of the arthropoda. *Journal of Comparative Neurology*, 6(3), 133-210. <https://doi.org/10.1002/cne.910060302>
- Kim, S. M., Su, C.-Y., & Wang, J. W. (2017). *Neuromodulation of Innate Behaviors in Drosophila*.
- Kim, Y.-C., Lee, H.-G., & Han, K.-A. (2007). D₁ Dopamine Receptor dDA1 Is Required in the Mushroom Body Neurons for Aversive and Appetitive Learning in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 27(29), 7640-7647. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1167-07.2007>
- Kim, Y.-K., Saver, M., Simon, J., Kent, C. F., Shao, L., Eddison, M., Agrawal, P., Texada, M., Truman, J. W., & Heberlein, U. (2018). Repetitive aggressive encounters generate a long-lasting internal state in *Drosophila melanogaster* males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(5), 1099-1104. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716612115>
- Kitamoto, T. (2001). Conditional modification of behavior in *Drosophila* by targeted expression of a temperature-sensitive shibire allele in defined neurons. *Journal of Neurobiology*, 47(2), 81-92. <https://doi.org/10.1002/neu.1018>
- Kiya, T., Morishita, K., Uchino, K., Iwami, M., & Sezutsu, H. (2014). Establishment of tools for neurogenetic analysis of sexual behavior in the silkworm, *Bombyx mori*. *PloS One*, 9(11), e113156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113156>
- Klapoetke, N. C., Murata, Y., Kim, S. S., Pulver, S. R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y. K., Morimoto, T. K., Chuong, A. S., Carpenter, E. J., Tian, Z., Wang, J., Xie, Y., Yan, Z., Zhang, Y., Chow, B. Y., Surek, B., Melkonian, M., Jayaraman, V., Constantine-Paton, M., ... Boyden, E. S. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nature Methods*, 11(3), 338-346. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2836>
- Kleszcz, A., Cholewińska, P., Front, G., Pacoń, J., Bodkowski, R., Janczak, M., & Dorobisz, T. (2022). Review on Selected Aggression Causes and the Role of Neurocognitive Science in the Diagnosis. *Animals*, 12(3), 281. <https://doi.org/10.3390/ani12030281>
- Knapp, E. M., Kaiser, A., Arnold, R. C., Sampson, M. M., Ruppert, M., Xu, L., Anderson, M. I., Bonanno, S. L., Scholz, H., Donlea, J. M., & Krantz, D. E. (2022). Mutation of the

BIBLIOGRAPHIE

- Drosophila melanogaster* serotonin transporter dSERT impacts sleep, courtship, and feeding behaviors. *PLoS Genetics*, 18(11), e1010289. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010289>
- Koganezawa, M., Kimura, K., & Yamamoto, D. (2016). The Neural Circuitry that Functions as a Switch for Courtship versus Aggression in *Drosophila* Males. *Current Biology*, 26(11), 1395-1403. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.017>
- König, C., Khalili, A., Niewalda, T., Gao, S., & Gerber, B. (2019). An optogenetic analogue of second-order reinforcement in *Drosophila*. *Biology Letters*, 15(7), 20190084. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0084>
- Kosaka, T., & Ikeda, K. (1983). Possible temperature-dependent blockage of synaptic vesicle recycling induced by a single gene mutation in *drosophila*. *Journal of Neurobiology*, 14(3), 207-225. <https://doi.org/10.1002/neu.480140305>
- Kravitz, E. A., & Fernandez, M. de la P. (2015). Aggression in *Drosophila*. *Behavioral Neuroscience*, 129(5), 549-563. <https://doi.org/10.1037/bne0000089>
- Krupp, J. J., & Levine, J. D. (2014). Neural Circuits : Anatomy of a Sexual Behavior. *Current Biology*, 24(8), R327-R329. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.009>
- Kuo, T.-H., Yew, J. Y., Fedina, T. Y., Dreisewerd, K., Dierick, H. A., & Pletcher, S. D. (2012). Aging modulates cuticular hydrocarbons and sexual attractiveness in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 215(5), 814-821. <https://doi.org/10.1242/jeb.064980>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature05672>
- Lacaille, F., Hiroi, M., Twele, R., Inoshita, T., Umemoto, D., Manière, G., Marion-Poll, F., Ozaki, M., Francke, W., Cobb, M., Everaerts, C., Tanimura, T., & Ferveur, J.-F. (2007). An Inhibitory Sex Pheromone Tastes Bitter for *Drosophila* Males. *PLoS ONE*, 2(8), e661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000661>
- Lagerspetz, K. (1964). Studies on the aggressive behaviour of mice. *Annales Academiae Scientiarum Fennicae, Series B*, 131, 1-131.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... Morgan, M. J. (2001). Initial sequencing

BIBLIOGRAPHIE

- and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Lasbleiz, C., Ferveur, J.-F., & Everaerts, C. (2006). Courtship behaviour of *Drosophila melanogaster* revisited. *Animal Behaviour*, 72(5), 1001-1012. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.01.027>
- Laturney, M., & Billeter, J.-C. (2016). *Drosophila melanogaster* females restore their attractiveness after mating by removing male anti-aphrodisiac pheromones. *Nature Communications*, 7(1), 12322. <https://doi.org/10.1038/ncomms12322>
- Lee, S. S., & Wu, M. N. (2020). Neural circuit mechanisms encoding motivational states in *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*, 64, 135-142. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2020.05.002>
- Lee, W.-P., Chiang, M.-H., Chang, L.-Y., Shyu, W.-H., Chiu, T.-H., Fu, T.-F., Wu, T., & Wu, C.-L. (2021). Serotonin Signals Modulate Mushroom Body Output Neurons for Sustaining Water-Reward Long-Term Memory in *Drosophila*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 755574. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.755574>
- Legros, J., Tang, G., Gautrais, J., Fernandez, M. P., & Trannoy, S. (2021). Long-Term Dietary Restriction Leads to Development of Alternative Fighting Strategies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14, 599676. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2020.599676>
- Leimar, O., Austad, I. S., & Enquist, M. (1990). *A Test of the Sequential Assessment Game : Fighting in the Bowl and Doily Spider Frontinella pyramitela*.
- Leimar, O., & McNamara, J. M. (2023). Game theory in biology: 50 years and onwards. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 378(1876), 20210509. <https://doi.org/10.1098/rstb.2021.0509>
- Leinwand, S. G., & Chalasani, S. H. (2011). Olfactory networks : From sensation to perception. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(6), 806-811. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.07.006>
- Levin, L. R., Han, P. L., Hwang, P. M., Feinstein, P. G., Davis, R. L., & Reed, R. R. (1992). The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell*, 68(3), 479-489. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90185-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90185-f)

BIBLIOGRAPHIE

- Levitis, D. A., Lidicker, W. Z., & Freund, G. (2009). Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Animal Behaviour*, 78(1), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.03.018>
- Lewbart, G. A., & Zachariah, T. T. (2023). Aquatic and Terrestrial Invertebrate Welfare. *Animals*, 13(21), 3375. <https://doi.org/10.3390/ani13213375>
- Li, F., Lindsey, J. W., Marin, E. C., Otto, N., Dreher, M., Dempsey, G., Stark, I., Bates, A. S., Pleijzier, M. W., Schlegel, P., Nern, A., Takemura, S., Eckstein, N., Yang, T., Francis, A., Braun, A., Parekh, R., Costa, M., Scheffer, L. K., ... Rubin, G. M. (2020). The connectome of the adult *Drosophila* mushroom body provides insights into function. *eLife*, 9, e62576. <https://doi.org/10.7554/eLife.62576>
- Lim, R. S., Eyjólfsson, E., Shin, E., Perona, P., & Anderson, D. J. (2014). How Food Controls Aggression in *Drosophila*. *PLoS ONE*, 9(8), e105626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105626>
- Liu, T., Wang, Y., Tian, Y., Zhang, J., Zhao, J., & Guo, A. (2020). The receptor channel formed by ppk25, ppk29 and ppk23 can sense the *Drosophila* female pheromone 7,11-heptacosadiene. *Genes, Brain, and Behavior*, 19(2), e12529. <https://doi.org/10.1111/gbb.12529>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nn.2836>
- Loranger, M. J., & Bertram, S. M. (2016). The effect of male dominance on female choice in a field cricket (*Gryllus assimilis*). *Animal Behaviour*, 114, 45-52. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.01.020>
- Lorenz, 1903-1989, Konrad Zacharias. (1969). L'agression : Une histoire naturelle du mal. In *L'agression une histoire naturelle du mal*.
- Lyketsos, C. G., Carrillo, M. C., Ryan, J. M., Khachaturian, A. S., Trzepacz, P., Amatniek, J., Cedarbaum, J., Brashear, R., & Miller, D. S. (2011). Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(5), 532-539. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2410>

BIBLIOGRAPHIE

- Ma, B., Wang, R., Liu, Y., Deng, B., Wang, T., Wu, F., & Zhou, C. (2022). Serotonin Signaling Modulates Sexual Receptivity of Virgin Female *Drosophila*. *Neuroscience Bulletin*, 38(11), 1277-1291. <https://doi.org/10.1007/s12264-022-00908-8>
- Mancini, N., Thoener, J., Tafani, E., Pauls, D., Maysseles, O., Strauch, M., Eichler, K., Champion, A., Kobler, O., Weber, D., Sen, E., Weiglein, A., Hartenstein, V., Chytoudis-Peroudis, C.-C., Jovanic, T., Thum, A. S., Rohwedder, A., Schleyer, M., & Gerber, B. (2023). Rewarding Capacity of Optogenetically Activating a Giant GABAergic Central-Brain Interneuron in Larval *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 43(44), 7393-7428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2310-22.2023>
- Martinovic-Weigelt, D., Ekman, D. R., Villeneuve, D. L., James, C. M., Teng, Q., Collette, T. W., & Ankley, G. T. (2012). Fishy aroma of social status : Urinary chemo-signalling of territoriality in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *PloS One*, 7(11), e46579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046579>
- Maruska, K. P. (2014). Social regulation of reproduction in male cichlid fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2014.04.038>
- Masek, P., & Keene, A. C. (2016). Gustatory processing and taste memory in *Drosophila*. *Journal of Neurogenetics*, 30(2), 112-121. <https://doi.org/10.1080/01677063.2016.1185104>
- Maslow, A. H. (1943). *A Theory of Human Motivation*.
- Matsumoto, K., Pinna, G., Puia, G., Guidotti, A., & Costa, E. (2005). Social isolation stress-induced aggression in mice : A model to study the pharmacology of neurosteroidogenesis. *Stress*, 8(2), 85-93. <https://doi.org/10.1080/10253890500159022>
- McClearn, G. E. (1971). Behavioral genetics. *Behavioral Science*, 16(1), 64-81. <https://doi.org/10.1002/bs.3830160106>
- McGlone, J. J. (1985). Olfactory cues and pig agonistic behavior : Evidence for a submissive pheromone. *Physiology & Behavior*, 34(2), 195-198. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90105-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90105-2)
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., & Davis, R. L. (2003). Spatiotemporal Rescue of Memory Dysfunction in *Drosophila*. *Science*, 302(5651), 1765-1768. <https://doi.org/10.1126/science.1089035>

BIBLIOGRAPHIE

- McKelvey, E. G. Z., Gyles, J. P., Michie, K., Barquín Pancorbo, V., Sober, L., Kruszewski, L. E., Chan, A., & Fabre, C. C. G. (2021). *Drosophila* females receive male substrate-borne signals through specific leg neurons during courtship. *Current Biology*, *31*(17), 3894-3904.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.002>
- Mhaouty-Kodja, S. (2020). Courtship vocalizations : A potential biomarker of adult exposure to endocrine disrupting compounds? *Molecular and Cellular Endocrinology*, *501*, 110664. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110664>
- Miczek, K. A., De Almeida, R. M. M., Kravitz, E. A., Rissman, E. F., De Boer, S. F., & Raine, A. (2007). Neurobiology of Escalated Aggression and Violence. *The Journal of Neuroscience*, *27*(44), 11803-11806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3500-07.2007>
- Mikami, K., Watanabe, N., Tochio, T., Kimoto, K., Akama, F., & Yamamoto, K. (2023). Impact of Gut Microbiota on Host Aggression : Potential Applications for Therapeutic Interventions Early in Development. *Microorganisms*, *11*(4), 1008. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041008>
- Miyamoto, T., & Amrein, H. (2008). Suppression of male courtship by a *Drosophila* pheromone receptor. *Nature Neuroscience*, *11*(8), 874-876. <https://doi.org/10.1038/nn.2161>
- Modi, M. N., Shuai, Y., & Turner, G. C. (2020). The *Drosophila* Mushroom Body : From Architecture to Algorithm in a Learning Circuit. *Annual Review of Neuroscience*, *43*(1), 465-484. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-080317-0621333>
- Monyak, R. E., Golbari, N. M., Chan, Y.-B., Pranevicius, A., Tang, G., Fernández, M. P., & Kravitz, E. A. (2021). Masculinized *Drosophila* females adapt their fighting strategies to their opponent. *Journal of Experimental Biology*, *224*(6), jeb238006. <https://doi.org/10.1242/jeb.238006>
- Morgan, T. H. (1910). Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science*, *32*(812), 120-122. <https://doi.org/10.1126/science.32.812.120>
- Moyer, K. E. (Kenneth E. (1976). The psychobiology of aggression / by K. E. Moyer. In *The psychobiology of aggression*. Harper & Row.
- Mundiyanapurath, S., Chan, Y.-B., Leung, A. K. W., & Kravitz, E. A. (2009). Feminizing cholinergic neurons in a male *Drosophila* nervous system enhances aggression. *Fly*, *3*(3), 179-184. <https://doi.org/10.4161/fly.3.3.8989>

BIBLIOGRAPHIE

- Muszynski, E., & Malaterre, C. (2020). Best behaviour: A proposal for a non-binary conceptualization of behaviour in biology. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, 79, 101222. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2019.101222>
- Nagy, Sz., Lindeberg, H., Nikitkina, E., Krutikova, A., Smith, E., Kumpula, J., & Holand, Ø. (2021). Reproduction of male reindeer (*Rangifer tarandus*). *Animal Reproduction Science*, 227, 106722. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106722>
- Nandy, B., Dasgupta, P., Halder, S., & Verma, T. (2016). Plasticity in aggression and the correlated changes in the cost of reproduction in male *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, 114, 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.01.019>
- Natarajan, D., & Caramaschi, D. (2010). Animal violence demystified. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00009>
- Neumann, I. D., Veenema, A. H., & Beiderbeck, D. I. (2010). Aggression and anxiety : Social context and neurobiological links. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2010.00012>
- Nichols, C. D., Becnel, J., & Pandey, U. B. (2012). Methods to Assay *Drosophila* Behavior. *Journal of Visualized Experiments*, 61, 3795. <https://doi.org/10.3791/3795>
- Nishihara, S., Ueda, R., Goto, S., Toyoda, H., Ishida, H., & Nakamura, M. (2004). Approach for functional analysis of glycan using RNA interference. *Glycoconjugate Journal*, 21(1-2), 63-68. <https://doi.org/10.1023/B:GLYC.0000043750.80389.14>
- Nishikawa, K., & Kidokoro, Y. (1999). Octopamine inhibits synaptic transmission at the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *Brain Research*, 837(1-2), 67-74. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01676-5](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01676-5)
- Nöbel, S., Danchin, E., & Isabel, G. (2023). Mate copying requires the coincidence detector Rutabaga in the mushroom bodies of *Drosophila melanogaster*. *iScience*, 26(9), 107682. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107682>
- Norville, K., Sweeney, S. T., & Elliott, C. J. H. (2010). Postmating change in physiology of male *Drosophila* mediated by serotonin (5-HT). *Journal of Neurogenetics*, 24(1), 27-32. <https://doi.org/10.3109/01677060903477601>

BIBLIOGRAPHIE

- Orfanos, Z. (2008). Transgenic tools for *Drosophila* muscle research. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 29(6-8), 185-188. <https://doi.org/10.1007/s10974-009-9166-0>
- Öztürk-Çolak, A., Marygold, S. J., Antonazzo, G., Attrill, H., Goutte-Gattat, D., Jenkins, V. K., Matthews, B. B., Millburn, G., Dos Santos, G., Tabone, C. J., FlyBase Consortium, Perrimon, N., Gelbart, S. R., Broll, K., Crosby, M., Dos Santos, G., Falls, K., Gramates, L. S., Jenkins, V. K., ... Lovato, T. (2024). FlyBase : Updates to the *Drosophila* genes and genomes database. *GENETICS*, 227(1), iyad211. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad211>
- Page, L., & Coates, J. (2017). Winner and loser effects in human competitions. Evidence from equally matched tennis players. *Evolution and Human Behavior*, 38(4), 530-535. <https://doi.org/10.1016/j.evolhumbehav.2017.02.003>
- Palavicino-Maggio, C. B., Chan, Y.-B., McKellar, C., & Kravitz, E. A. (2019). A small number of cholinergic neurons mediate hyperaggression in female *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(34), 17029-17038. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907042116>
- Palavicino-Maggio, C. B., & Sengupta, S. (2022). The Neuromodulatory Basis of Aggression : Lessons From the Humble Fruit Fly. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 836666. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.836666>
- Parise, L. F., Joseph Burnett, C., & Russo, S. J. (2023). Early life stress and altered social behaviors : A perspective across species. *Neuroscience Research*, S0168010223002006. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2023.11.005>
- Parker, G. A. (1974). Assessment strategy and the evolution of fighting behaviour. *Journal of Theoretical Biology*, 47(1), 223-243. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(74\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0022-5193(74)90111-8)
- Patki, G., Atrooz, F., Alkadhi, I., Solanki, N., & Salim, S. (2015). High aggression in rats is associated with elevated stress, anxiety-like behavior, and altered catecholamine content in the brain. *Neuroscience Letters*, 584, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.10.051>
- Pavlou, H. J., Lin, A. C., Neville, M. C., Nojima, T., Diao, F., Chen, B. E., White, B. H., & Goodwin, S. F. (2016). Neural circuitry coordinating male copulation. *eLife*, 5, e20713. <https://doi.org/10.7554/eLife.20713>

BIBLIOGRAPHIE

- Pavlovsky, A., Schor, J., Plaçais, P.-Y., & Preat, T. (2018). A GABAergic Feedback Shapes Dopaminergic Input on the *Drosophila* Mushroom Body to Promote Appetitive Long-Term Memory. *Current Biology*, 28(11), 1783-1793.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.040>
- Pemberton, D. J., Franks, C. J., Walker, R. J., & Holden-Dye, L. (2001). Characterization of Glutamate-Gated Chloride Channels in the Pharynx of Wild-Type and Mutant *Caenorhabditis elegans* Delineates the Role of the Subunit GluCl- α 2 in the Function of the Native Receptor. *Molecular Pharmacology*, 59(5), 1037-1043. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1037>
- Penn, J. K. M., Zito, M. F., & Kravitz, E. A. (2010). A single social defeat reduces aggression in a highly aggressive strain of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(28), 12682-12686. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007016107>
- Perisse, E., Oswald, D., Barnstedt, O., Talbot, C. B., Huetteroth, W., & Waddell, S. (2016). Aversive Learning and Appetitive Motivation Toggle Feed-Forward Inhibition in the *Drosophila* Mushroom Body. *Neuron*, 90(5), 1086-1099. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.04.034>
- Perry, C. J., & Barron, A. B. (2013). Neural Mechanisms of Reward in Insects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 543-562. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153631>
- Petruelis, A. (2013). Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Hormones and Behavior*, 63(5), 723-741. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.03.011>
- Pitman, J. L., Huetteroth, W., Burke, C. J., Krashes, M. J., Lai, S.-L., Lee, T., & Waddell, S. (2011). A Pair of Inhibitory Neurons Are Required to Sustain Labile Memory in the *Drosophila* Mushroom Body. *Current Biology*, 21(10), 855-861. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.069>
- Plaçais, P.-Y., De Tredern, É., Scheunemann, L., Trannoy, S., Goguel, V., Han, K.-A., Isabel, G., & Preat, T. (2017). Upregulated energy metabolism in the *Drosophila* mushroom body is the trigger for long-term memory. *Nature Communications*, 8(1), 15510. <https://doi.org/10.1038/ncomms15510>
- Plaza, S. M., Clements, J., Dolafi, T., Umayam, L., Neubarth, N. N., Scheffer, L. K., & Berg, S. (2022). neuPrint : An open access tool for EM connectomics. *Frontiers in Neuroinformatics*, 16, 896292. <https://doi.org/10.3389/fninf.2022.896292>

BIBLIOGRAPHIE

- Pooryasin, A., & Fiala, A. (2015). Identified Serotonin-Releasing Neurons Induce Behavioral Quiescence and Suppress Mating in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, 35(37), 12792-12812. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1638-15.2015>
- Prasad, P., Ogawa, S., & Parhar, I. S. (2015). Role of serotonin in fish reproduction. *Frontiers in Neuroscience*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00195>
- Prigent, S. R., & Rajpurohit, S. (2007). Genome, Evolution, *Drosophila* and Beyond : The New Dimensions. *Fly*, 1(5), 297-302. <https://doi.org/10.4161/fly.5244>
- Prunier, A., & Trannoy, S. (2024). Learning from fights : Males' social dominance status impact reproductive success in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, 19(3), e0299839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0299839>
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Logiciel]. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M., & Bier, E. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, 11(6), 1114-1125. <https://doi.org/10.1101/gr.169101>
- Reproductive behavior | Definition, Examples, Animals, & Facts | Britannica*. (2024, janvier 30). <https://www.britannica.com/science/reproductive-behaviour-zoology>
- Richter, C., Gras, P., Hodges, K., Ostner, J., & Schülke, O. (2015). Feeding behavior and aggression in wild Siberut macaques (*Macaca siberu*) living under low predation risk. *American Journal of Primatology*, 77(7), 741-752. <https://doi.org/10.1002/ajp.22393>
- Rillich, J., & Stevenson, P. A. (2011). Winning Fights Induces Hyperaggression via the Action of the Biogenic Amine Octopamine in Crickets. *PLoS ONE*, 6(12), e28891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028891>
- Rings, A., & Goodwin, S. F. (2019). To court or not to court – a multimodal sensory decision in *Drosophila* males. *Current Opinion in Insect Science*, 35, 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.06.009>
- Robinson, G. E., Fernald, R. D., & Clayton, D. F. (2008). Genes and Social Behavior. *Science*, 322(5903), 896-900. <https://doi.org/10.1126/science.1159277>

BIBLIOGRAPHIE

- Rouse, J., & Bretman, A. (2016). Exposure time to rivals and sensory cues affect how quickly males respond to changes in sperm competition threat. *Animal Behaviour*, *122*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.09.011>
- Rubin, G. M., & Aso, Y. (2024). New genetic tools for mushroom body output neurons in *Drosophila*. *eLife*, *12*, RP90523. <https://doi.org/10.7554/eLife.90523.3>
- Ruenraroengsak, P., Kiryushko, D., Theodorou, I. G., Klosowski, M. M., Taylor, E. R., Niriella, T., Palmieri, C., Yagüe, E., Ryan, M. P., Coombes, R. C., Xie, F., & Porter, A. E. (2019). Frizzled-7-targeted delivery of zinc oxide nanoparticles to drug-resistant breast cancer cells. *Nanoscale*, *11*(27), 12858-12870. <https://doi.org/10.1039/c9nr01277j>
- Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.
- Rutte, C., Taborsky, M., & Brinkhof, M. W. G. (2006). What sets the odds of winning and losing? *Trends in Ecology & Evolution*, *21*(1), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.10.014>
- Ryvkin, J., Omesi, L., Kim, Y.-K., Levi, M., Pozeilov, H., Barak-Buchris, L., Agranovich, B., Abramovich, I., Gottlieb, E., Jacob, A., Nässel, D. R., Heberlein, U., & Shohat-Ophir, G. (2024). Failure to mate enhances investment in behaviors that may promote mating reward and impairs the ability to cope with stressors via a subpopulation of Neuropeptide F receptor neurons. *PLOS Genetics*, *20*(1), e1011054. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1011054>
- Saad, L. O., Schwaha, T., Handschuh, S., Wanninger, A., & Marian, J. E. A. R. (2018). A mating plug in a squid? Sneaker spermatophores can block the female sperm-storage organ in *Doryteuthis plei*. *Zoology*, *130*, 47-56. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.08.002>
- Sabandal, J. M., Sabandal, P. R., Kim, Y.-C., & Han, K.-A. (2020). Concerted Actions of Octopamine and Dopamine Receptors Drive Olfactory Learning. *The Journal of Neuroscience*, *40*(21), 4240-4250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1756-19.2020>
- Sabandal, P. R., Saldaña, E. B., & Han, K.-A. (2022). Acetylcholine deficit causes dysfunctional inhibitory control in an aging-dependent manner. *Scientific Reports*, *12*(1), 20903. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25402-z>

BIBLIOGRAPHIE

- 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. <https://doi.org/10.1002/neu.20262>
- Salzberg, Y., Haque, R., & Oren-Suissa, M. (2023). The synaptic basis for sexual dimorphism in the invertebrate nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 82, 102757. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2023.102757>
- Sandholm, W. H. (2007). *Evolutionary Game Theory*.
- Sanfilippo, P., Kim, A. J., Bhukel, A., Yoo, J., Mirshahidi, P. S., Pandey, V., Bevir, H., Yuen, A., Mirshahidi, P. S., Guo, P., Li, H.-S., Wohlschlegel, J. A., Aso, Y., & Zipursky, S. L. (2024). Mapping of multiple neurotransmitter receptor subtypes and distinct protein complexes to the connectome. *Neuron*, 112(6), 942-958.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.12.014>
- Sapolsky, R. M. (2005). The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. *Science*, 308(5722), 648-652. <https://doi.org/10.1126/science.1106477>
- Sato, K., & Yamamoto, D. (2020). The mode of action of Fruitless : Is it an easy matter to switch the sex? *Genes, Brain and Behavior*, 19(2), e12606. <https://doi.org/10.1111/gbb.12606>
- Sato, S., Ueno, K., Saitoe, M., & Sakai, T. (2018). Synaptic depression induced by postsynaptic cAMP production in the *Drosophila* mushroom body calyx. *The Journal of Physiology*, 596(12), 2447-2461. <https://doi.org/10.1113/JP275799>
- Saumweber, T., Rohwedder, A., Schleyer, M., Eichler, K., Chen, Y., Aso, Y., Cardona, A., Eschbach, C., Kobler, O., Voigt, A., Durairaja, A., Mancini, N., Zlatić, M., Truman, J. W., Thum, A. S., & Gerber, B. (2018). Functional architecture of reward learning in mushroom body extrinsic neurons of larval *Drosophila*. *Nature Communications*, 9(1), 1104. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03130-1>
- Sayin, S., De Backer, J.-F., Siju, K. P., Wosniack, M. E., Lewis, L. P., Frisch, L.-M., Gansen, B., Schlegel, P., Edmondson-Stait, A., Sharifi, N., Fisher, C. B., Calle-Schuler, S. A., Lauritzen, J. S., Bock, D. D., Costa, M., Jefferis, G. S. X. E., Gjorgjieva, J., & Grunwald Kadow, I. C. (2019). A Neural Circuit Arbitrates between Persistence and Withdrawal in Hungry *Drosophila*. *Neuron*, 104(3), 544-558.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.028>
- Schlegel, P., Yin, Y., Bates, A. S., Dorkenwald, S., Eichler, K., Brooks, P., Han, D. S., Gkantia, M., Dos Santos, M., Munnelly, E. J., Badalamente, G., Capdevila, L. S., Sane, V. A., Pleijzier,

BIBLIOGRAPHIE

- M. W., Tamimi, I. F. M., Dunne, C. R., Salgarella, I., Javier, A., Fang, S., ... Jefferis, G. S. X. E. (2023). *Whole-brain annotation and multi-connectome cell typing quantifies circuit stereotypy in Drosophila*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.27.546055>
- Schlinger, B. A., Schultz, J. D., & Hertel, F. (2001). Neuromuscular and Endocrine Control of an Avian Courtship Behavior. *Hormones and Behavior*, 40(2), 276-280. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1669>
- 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*. *The Journal of Neuroscience*, 23(33), 10495-10502. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-33-10495.2003>
- Schwartzter, J. J., Ricci, L. A., & Melloni, R. H. (2013). Prior Fighting Experience Increases Aggression in Syrian Hamsters : Implications for a Role of Dopamine in the Winner Effect: Dopamine Alterations in Trained Fighters. *Aggressive Behavior*, 39(4), 290-300. <https://doi.org/10.1002/ab.21476>
- Scott, J. P. (1969). *Understanding aggression*.
- Scott, K. (2018). Gustatory Processing in *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 15-30. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043331>
- Selcho, M. (2024). Octopamine in the mushroom body circuitry for learning and memory. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 31(5), a053839. <https://doi.org/10.1101/lm.053839.123>
- Sengupta, S., Chan, Y.-B., Palavicino-Maggio, C. B., & Kravitz, E. A. (2022). GABA transmission from mAL interneurons regulates aggression in *Drosophila* males. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(5), e2117101119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117101119>
- Seward, J. P. (1946). Aggressive behavior in the rat. IV. Submission as determined by conditioning, extinction, and disuse. *Journal of Comparative Psychology*, 39(1), 51-76. <https://doi.org/10.1037/h0055885>
- Shen, P., Wan, X., Wu, F., Shi, K., Li, J., Gao, H., Zhao, L., & Zhou, C. (2023). Neural circuit mechanisms linking courtship and reward in *Drosophila* males. *Current Biology*, 33(10), 2034-2050.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2023.04.041>

BIBLIOGRAPHIE

- Sherer, L. M., Catudio Garrett, E., Morgan, H. R., Brewer, E. D., Sirrs, L. A., Shearin, H. K., Williams, J. L., McCabe, B. D., Stowers, R. S., & Certel, S. J. (2020). Octopamine neuron dependent aggression requires dVGLUT from dual-transmitting neurons. *PLOS Genetics*, *16*(2), e1008609. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008609>
- Sherwin, E., Bordenstein, S. R., Quinn, J. L., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2019). Microbiota and the social brain. *Science*, *366*(6465), eaar2016. <https://doi.org/10.1126/science.aar2016>
- Shi, X., Xiang, S., Cao, J., Zhu, H., Yang, B., He, Q., & Ying, M. (2019). Kelch-like proteins : Physiological functions and relationships with diseases. *Pharmacological Research*, *148*, 104404. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104404>
- Shine, R. (2003). Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *270*(1519), 995-1004. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2307>
- Sibarov, D. A., & Antonov, S. M. (2018). Calcium-Dependent Desensitization of NMDA Receptors. *Biochemistry. Biokhimiia*, *83*(10), 1173-1183. <https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
- Siever, L. J. (2008). Neurobiology of Aggression and Violence. *American Journal of Psychiatry*, *165*(4), 429-442. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2008.07111774>
- Sivinski, J. (1978). Intrasexual Aggression in the Stick Insects *Diaperomera Veliei* and *D. Covilleae* and Sexual Dimorphism in the Phasmatodea. *Psyche: A Journal of Entomology*, *85*(4), 395-405. <https://doi.org/10.1155/1978/35784>
- Smith, J. M., & Price, G. R. (1973). *The logic of Animal Conflict*. 246, 4.
- Smith, N. M. T., & Dukas, R. (2024). Winner and loser effects in humans : Evidence from randomized trials. *Animal Behaviour*, *207*, 101-107. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2023.10.017>
- Spool, J. A., & Ritters, L. V. (2017). Associations Between Environmental Resources and the “Wanting” and “Liking” of Male Song in Female Songbirds. *Integrative and Comparative Biology*, *57*(4), 835-845. <https://doi.org/10.1093/icb/ix117>
- Sturtevant, A. H. (1915). *Experiments on sex recognition and the problem of sexual selection in Drosophila*.

BIBLIOGRAPHIE

- Sue Carter, C., Courtney Devries, A., & Getz, L. L. (1995). Physiological substrates of mammalian monogamy: The prairie vole model. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *19*(2), 303-314. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00070-H](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00070-H)
- Sun, M., Ma, M., Deng, B., Li, N., Peng, Q., & Pan, Y. (2023). A neural pathway underlying hunger modulation of sexual receptivity in *Drosophila* females. *Cell Reports*, *42*(10), 113243. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113243>
- Tabb, J. S., Kish, P. E., Van Dyke, R., & Ueda, T. (1992). Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *The Journal of Biological Chemistry*, *267*(22), 15412-15418.
- Taisz, I., Donà, E., Münch, D., Bailey, S. N., Morris, B. J., Meechan, K. I., Stevens, K. M., Varela-Martínez, I., Gkantia, M., Schlegel, P., Ribeiro, C., Jefferis, G. S. X. E., & Galili, D. S. (2023). Generating parallel representations of position and identity in the olfactory system. *Cell*, *186*(12), 2556-2573.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.04.038>
- Takahashi, A. (2022). Social Stress and Aggression in Murine Models. In K. A. Miczek & R. Sinha (Éds.), *Neuroscience of Social Stress* (p. 181-208). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/7854_2021_243
- Takahashi, A., Lee, R. X., Iwasato, T., Itohara, S., Arima, H., Bettler, B., Miczek, K. A., & Koide, T. (2015). Glutamate Input in the Dorsal Raphe Nucleus As a Determinant of Escalated Aggression in Male Mice. *The Journal of Neuroscience*, *35*(16), 6452-6463. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2450-14.2015>
- Takahashi, A., Quadros, I. M., De Almeida, R. M. M., & Miczek, K. A. (2011). Behavioral and Pharmacogenetics of Aggressive Behavior. In J. F. Cryan & A. Reif (Éds.), *Behavioral Neurogenetics* (Vol. 12, p. 73-138). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/7854_2011_191
- Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch's 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, *54*(2).
- Teseo, S., Veerus, L., & Mery, F. (2016). Fighting experience affects fruit fly behavior in a mating context. *The Science of Nature*, *103*(5-6), 38. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1368-x>

BIBLIOGRAPHIE

- Thorne, N., Chromey, C., Bray, S., & Amrein, H. (2004). Taste Perception and Coding in *Drosophila*. *Current Biology*, *14*(12), 1065-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.05.019>
- Tibbetts, E. A., Pardo-Sanchez, J., & Weise, C. (2022). The establishment and maintenance of dominance hierarchies. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *377*(1845), 20200450. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0450>
- Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of Ethology. *Zeitschrift Für Tierpsychologie*, *20*(4), 410-433. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1963.tb01161.x>
- Tinbergen, N. (1968). On War and Peace in Animals and Man : An ethologist's approach to the biology of aggression. *Science*, *160*(3835), 1411-1418. <https://doi.org/10.1126/science.160.3835.1411>
- Tomchik, S. M., & Davis, R. L. (2009). Dynamics of Learning-Related cAMP Signaling and Stimulus Integration in the *Drosophila* Olfactory Pathway. *Neuron*, *64*(4), 510-521. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.09.029>
- Tóth, M., Halász, J., Mikics, É., Barsy, B., & Haller, J. (2008). Early social deprivation induces disturbed social communication and violent aggression in adulthood. *Behavioral Neuroscience*, *122*(4), 849-854. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.4.849>
- Trannoy, S., Chowdhury, B., & Kravitz, E. A. (2015). A New Approach that Eliminates Handling for Studying Aggression and the « Loser » Effect in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualized Experiments*, *106*, 53395. <https://doi.org/10.3791/53395>
- Trannoy, S., Fernandez, M. P., & Certel, S. J. (2023). Comparing Methods for Quantifying and Analyzing *Drosophila* Aggression. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2023*(9), pdb.prot108144. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot108144>
- Trannoy, S., & Kravitz, E. A. (2017). Strategy changes in subsequent fights as consequences of winning and losing in fruit fly fights. *Fly*, *11*(2), 129-138. <https://doi.org/10.1080/19336934.2016.1259041>
- Trannoy, S., Penn, J., Lucey, K., Popovic, D., & Kravitz, E. A. (2016). Short and long-lasting behavioral consequences of agonistic encounters between male *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(17), 4818-4823. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520953113>

BIBLIOGRAPHIE

- Trott, A. R., Donelson, N. C., Griffith, L. C., & Ejima, A. (2012). Song choice is modulated by female movement in *Drosophila* males. *PloS One*, 7(9), e46025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046025>
- Ueda, A., & Kidokoro, Y. (2002). Aggressive behaviours of female *Drosophila melanogaster* are influenced by their social experience and food resources. *Physiological Entomology*, 27(1), 21-28. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.2002.00262.x>
- Van De Poll, N. E., De Jonge, F., Van Oyen, H. G., & Van Pelt, J. (1982). Aggressive behaviour in rats: Effects of winning or losing on subsequent aggressive interactions. *Behavioural Processes*, 7(2), 143-155. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(82\)90023-7](https://doi.org/10.1016/0376-6357(82)90023-7)
- Verschut, T. A., Ng, R., Doubovetzky, N. P., Le Calvez, G., Sneep, J. L., Minnaard, A. J., Su, C.-Y., Carlsson, M. A., Wertheim, B., & Billeter, J.-C. (2023). Aggregation pheromones have a non-linear effect on oviposition behavior in *Drosophila melanogaster*. *Nature Communications*, 14(1), 1544. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37046-2>
- Verzijden, M. N., Ten Cate, C., Servedio, M. R., Kozak, G. M., Boughman, J. W., & Svensson, E. I. (2012). The impact of learning on sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 27(9), 511-519. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.007>
- Vijendravarma, R. K., Narasimha, S., Steinfath, E., Clemens, J., & Leopold, P. (2022). *Drosophila* females have an acoustic preference for symmetric males. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(13), e2116136119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2116136119>
- Villella, A., & Hall, J. C. (2008). Chapter 3 Neurogenetics of Courtship and Mating in *Drosophila*. In *Advances in Genetics* (Vol. 62, p. 67-184). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)00603-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)00603-2)
- Von Philipsborn, A. C., Shohat-Ophir, G., & Rezaval, C. (2023). Single-Pair Courtship and Competition Assays in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2023(7), pdb.prot108105. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot108105>
- Vrontou, E., Nilsen, S. P., Demir, E., Kravitz, E. A., & Dickson, B. J. (2006). Fruitless regulates aggression and dominance in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, 9(12), 1469-1471. <https://doi.org/10.1038/nn1809>

BIBLIOGRAPHIE

- Wang, L., & Anderson, D. J. (2010). Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature*, *463*(7278), 227-231. <https://doi.org/10.1038/nature08678>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nn.2800>
- Wang, Z., Singhvi, A., Kong, P., & Scott, K. (2004). Taste Representations in the *Drosophila* Brain. *Cell*, *117*(7), 981-991. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.011>
- Watanabe, K., Chiu, H., Pfeiffer, B. D., Wong, A. M., Hoopfer, E. D., Rubin, G. M., & Anderson, D. J. (2017). A Circuit Node that Integrates Convergent Input from Neuromodulatory and Social Behavior-Promoting Neurons to Control Aggression in *Drosophila*. *Neuron*, *95*(5), 1112-1128.e7. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.017>
- Wicker-Thomas, C. (2007). Pheromonal communication involved in courtship behavior in Diptera. *Journal of Insect Physiology*, *53*(11), 1089-1100. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.07.003>
- Wilkinson, P. F., & Shank, C. C. (1976). Rutting-fight mortality among musk oxen on Banks Island, Northwest Territories, Canada. *Animal Behaviour*, *24*(4), 756-758. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(76\)80004-8](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(76)80004-8)
- Wu, L.-J., Steenland, H. W., Kim, S. S., Isiegas, C., Abel, T., Kaang, B.-K., & Zhuo, M. (2008). Enhancement of Presynaptic Glutamate Release and Persistent Inflammatory Pain by Increasing Neuronal cAMP in the Anterior Cingulate Cortex. *Molecular Pain*, *4*, 1744-8069-4-40. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-40>
- Xiong, Y., Hong, H., Liu, C., & Zhang, Y. Q. (2023). Social isolation and the brain : Effects and mechanisms. *Molecular Psychiatry*, *28*(1), 191-201. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01835-w>
- Yadav, R., Gupta, S. C., Hillman, B. G., Bhatt, J. M., Stairs, D. J., & Dravid, S. M. (2012). Deletion of Glutamate Delta-1 Receptor in Mouse Leads to Aberrant Emotional and Social Behaviors. *PLoS ONE*, *7*(3), e32969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032969>

BIBLIOGRAPHIE

- Yamaguchi, T. (2022). Neural circuit mechanisms of sex and fighting in male mice. *Neuroscience Research*, *174*, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2021.06.005>
- Yamamoto, D., & Koganezawa, M. (2013). Genes and circuits of courtship behaviour in *Drosophila* males. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(10), 681-692. <https://doi.org/10.1038/nrn3567>
- Yamamoto, D., & Kohatsu, S. (2017). What does the *fruitless* gene tell us about nature vs. Nurture in the sex life of *Drosophila*? *Fly*, *11*(2), 139-147. <https://doi.org/10.1080/19336934.2016.1263778>
- Yamamoto, D., Sato, K., & Koganezawa, M. (2014). Neuroethology of male courtship in *Drosophila*: From the gene to behavior. *Journal of Comparative Physiology A*, *200*(4), 251-264. <https://doi.org/10.1007/s00359-014-0891-5>
- Yang, Y. T., Hu, S. W., Li, X., Sun, Y., He, P., Kohlmeier, K. A., & Zhu, Y. (2023). Sex peptide regulates female receptivity through serotonergic neurons in *Drosophila*. *iScience*, *26*(3), 106123. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106123>
- Yew, J. Y., Dreisewerd, K., Luftmann, H., Müthing, J., Pohlentz, G., & Kravitz, E. A. (2009). A new male sex pheromone and novel cuticular cues for chemical communication in *Drosophila*. *Current Biology: CB*, *19*(15), 1245-1254. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.06.037>
- Youn, H., Kirkhart, C., Chia, J., & Scott, K. (2018). A subset of octopaminergic neurons that promotes feeding initiation in *Drosophila melanogaster*. *PLOS ONE*, *13*(6), e0198362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198362>
- Young, L. J., Lim, M. M., Gingrich, B., & Insel, T. R. (2001). Cellular Mechanisms of Social Attachment. *Hormones and Behavior*, *40*(2), 133-138. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1691>
- Yu, D., Keene, A. C., Srivatsan, A., Waddell, S., & Davis, R. L. (2005). *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell*, *123*(5), 945-957. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.037>
- Yuan, Q., Song, Y., Yang, C.-H., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (2014). Female contact modulates male aggression via a sexually dimorphic GABAergic circuit in *Drosophila*. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 81-88. <https://doi.org/10.1038/nn.3581>

BIBLIOGRAPHIE

- Yuan, R., Hascup, E., Hascup, K., & Bartke, A. (2023). Relationships among Development, Growth, Body Size, Reproduction, Aging, and Longevity – Trade-Offs and Pace-Of-Life. *Biochemistry (Moscow)*, 88(11), 1692-1703. <https://doi.org/10.1134/S0006297923110020>
- Yund, P. O., & McCartney, M. A. (1994). Male Reproductive Success in Sessile Invertebrates : Competition for Fertilizations. *Ecology*, 75(8), 2151-2167. <https://doi.org/10.2307/1940874>
- Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A. C., & Kravitz, E. A. (2006). Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46), 17519-17524. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608211103>
- Zabegalov, K. N., Kolesnikova, T. O., Khatsko, S. L., Volgin, A. D., Yakovlev, O. A., Amstislavskaya, T. G., Friend, A. J., Bao, W., Alekseeva, P. A., Lakstygal, A. M., Meshalkina, D. A., Demin, K. A., De Abreu, M. S., Rosemberg, D. B., & Kalueff, A. V. (2019). Understanding zebrafish aggressive behavior. *Behavioural Processes*, 158, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.11.010>
- Zars, T. (2000). Behavioral functions of the insect mushroom bodies. *Current Opinion in Neurobiology*, 10(6), 790-795. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(00\)00147-1](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00147-1)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90057-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90057-0)
- Zeng, J., Li, X., Zhang, R., Lv, M., Wang, Y., Tan, K., Xia, X., Wan, J., Jing, M., Zhang, X., Li, Y., Yang, Y., Wang, L., Chu, J., Li, Y., & Li, Y. (2023). Local 5-HT signaling bi-directionally regulates the coincidence time window for associative learning. *Neuron*, 111(7), 1118-1135.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.12.034>
- Zhang, J., Cao, C., Gao, H., Yang, Z., Sun, L., Zhang, Z., & Wang, Z. (2003). Effects of weasel odor on behavior and physiology of two hamster species. *Physiology & Behavior*, 79(4-5), 549-552. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00123-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00123-9)
- Zhang, S. X., Miner, L. E., Boutros, C. L., Rogulja, D., & Crickmore, M. A. (2018). Motivation, Perception, and Chance Converge to Make a Binary Decision. *Neuron*, 99(2), 376-388.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.014>
- Zhang, S. X., Rogulja, D., & Crickmore, M. A. (2016). Dopaminergic Circuitry Underlying Mating Drive. *Neuron*, 91(1), 168-181. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.020>

BIBLIOGRAPHIE

- Zhang, S. X., Rogulja, D., & Crickmore, M. A. (2019). Recurrent Circuitry Sustains *Drosophila* Courtship Drive While Priming Itself for Satiety. *Current Biology: CB*, 29(19), 3216-3228.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.08.015>
- Zhao, H., Jiang, X., Ma, M., Xing, L., Ji, X., & Pan, Y. (2024). A neural pathway for social modulation of spontaneous locomotor activity (SoMo-SLA) in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(9), e2314393121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2314393121>
- Zhao, Z., & McBride, C. S. (2020). Evolution of olfactory circuits in insects. *Journal of Comparative Physiology A*, 206(3), 353-367. <https://doi.org/10.1007/s00359-020-01399-6>
- Zheng, Z., Lauritzen, J. S., Perlman, E., Robinson, C. G., Nichols, M., Milkie, D., Torrens, O., Price, J., Fisher, C. B., Sharifi, N., Calle-Schuler, S. A., Kmecova, L., Ali, I. J., Karsh, B., Trautman, E. T., Bogovic, J. A., Hanslovsky, P., Jefferis, G. S. X. E., Kazhdan, M., ... Bock, D. D. (2018). A Complete Electron Microscopy Volume of the Brain of Adult *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 174(3), 730-743.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.019>
- Zhou, C., Rao, Y., & Rao, Y. (2008). A subset of octopaminergic neurons are important for *Drosophila* aggression. *Nature Neuroscience*, 11(9), 1059-1067. <https://doi.org/10.1038/nn.2164>
- Zhou, M., Chen, N., Tian, J., Zeng, J., Zhang, Y., Zhang, X., Guo, J., Sun, J., Li, Y., Guo, A., & Li, Y. (2019). Suppression of GABAergic neurons through D2-like receptor secures efficient conditioning in *Drosophila* aversive olfactory learning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(11), 5118-5125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812342116>
- Ziegler, A. B., Berthelot-Grosjean, M., & Grosjean, Y. (2013). The smell of love in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00072>
- Zwarts, L., Magwire, M. M., Carbone, M. A., Versteven, M., Herteleer, L., Anholt, R. R. H., Callaerts, P., & Mackay, T. F. C. (2011). Complex genetic architecture of *Drosophila* aggressive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(41), 17070-17075. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113877108>

ANNEXES

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLE COMPLET POUR L'IMAGERIE CALCIQUE IN VIVO.....	195
ANNEXE 2 : TAPIS ROULANT A PHEROMONE POUR IMAGERIE CALCIQUE <i>IN VIVO</i>.....	204

PROCOLE DISSECTION

Objective: Be able to prepare and make a dissection, perform calcium imaging in response to a stimulus and analyse data from the imaging.

NB: Flies must be at least 4 days old, otherwise the cuticle would be too soft and thus hard to dissect.

Step 1: Before dissecting (20-30mn)

- 1) Turn on the Pelletier Pad and let it cool for ~20-30mn before starting dissections.
- 2) Fill a polystyrene cube with ice from the ice machine in the Chemicals Preparation Room
- 3) Prepare some strips in advance

Prepare a strip

Materials:

- 2 strips
- paper perforator
- scissors
- 1 minutien pins (0.1mm)
- 2 little pieces of cut electronic tape
- optical glue
- a brush
- UV lamp (⚠ use appropriate protection: **plastic glasses** ⚠)

- 1) Perforate your 2 strips with the paper perforator. *(NB: if you want to prepare many perforated strips in advance, take care to not perforate too much strips at a time. Otherwise you will get hard marks on borders around the hole and this*

will complicate the contact between your strips and the minutien pin positioning)

- 2) Cut one strip with the scissors in order to get a smaller square with the hole at the center. Keep approximately 0.5cm between the hole and the edge of the strip.
- 3) Find the "soft" side of the larger strip with your finger and with a brush, put optical glue around the hole on this side.
- 4) Find the "hard" side of the smaller strip with your finger and put this side on the optical glue you put on the larger one.
- 5) Polymerise the glue with UV around 10 seconds (**⚠ use plastic glasses ⚠**).
- 6) Turn your strips to get the side with only the larger strip. Put the minutien pin (0.1mm) to divide the hole in 2/3 – 1/3 way.
- 7) Stick the minutien with 2 tapes at each side. Take care to not stick them too close to the hole, you will need some space to glue the minutien latter with optical glue (see Step 2, 9)).
- 8) Well done!

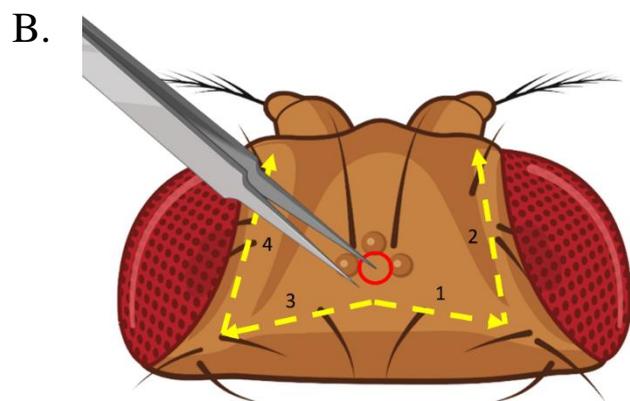
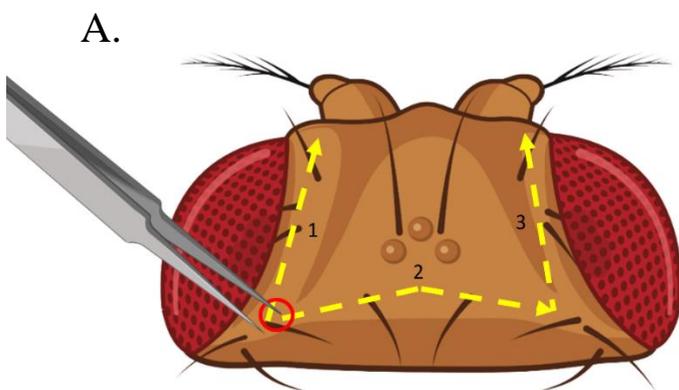
Step 2: Dissection (20-30mn)

Materials:

- Polystyrene cube filled with ice
- Binocular loupe with the dissection setup (adjustable supports)
- Pelletier pad
- Prepared strip
- Fine forceps (Dumont 5SF FST 11252-00 & Student Fine Forceps FST 91115-12)
- Handcrafted minutien-pencil
- Drosophila physiological liquid
- P20 pipette set on 10 μ L
- Optical glue index 68 (thick) and 81 (fluid)
- A nacelle
- A brush
- UV lamp (⚠ use appropriate protection: **plastic glasses** ⚠)

- 1) Turn on the Pelletier pad for 20-30mn and prepare a nacelle with one or two drops of thick and fluid optical glue.
- 2) Once the pad cold, put the tube with the fly in the ice for 2 minutes to cold-anesthetize the fly. It can be a bit longer but it is better if it does not exceed 5 minutes.
- 3) Take the tube out from the ice and put the fly on the pad.
- 4) Position the fly on its back and center it in the middle of the loupe.
- 5) Put the strip on the fixation and align the minutien pin with the neck of the fly.
- 6) By using the adjustable support, bring down the strip.
- 7) Take the handcrafter minutien-pencil, put some fluid glue on the needle and carefully glue the fly to the strips' minutien pin. **It is absolutely needed to not glue the two front legs.** If such case happened (and it will, do not give up!), retry with another fly. Bonus points if neither proboscis and antennas are not glued as well. Once done, polymerise with UV lamp (⚠ use **plastic glasses** ⚠).

- 8) Flip the strip and check the orientation of the fly. The body should be slightly oriented down. To correct the orientation, take the Student Fine Forceps (the larger one), pinch gently the minuten pin and move toward the required direction. This step is easier with used tape.
- 9) Once the orientation corrected, flip again the strip and put two dots of optical glue to each side of the pin and polymerise it with the UV lamp few seconds (**⚠ use plastic glasses ⚠**). Take off the tapes and keep them for another strip.
- 10) Do a last flip with the strip and put the head of the fly under your loupe, and zoom as maximum as possible.
- 11) Take the 5SF Forceps (be really careful, it is fragile!) and start dissecting the head's cuticle. If the fly has been well glued, the head should not move. If it is the case, try to reinforce Different ways are available:
- 12)
 - a. Start from a corner by piercing the cuticle and go up, following the edge of the eye. Then cut the down side of the cuticle and same, go up following the other eye.
 - b. Start from the ocelli situated in the middle down of the head. Then cut progressively toward one eye. Then go up, following the edge of the eye. Do the same on the other side.



- 13) Put a drop of physiological liquid. Then remove the cuticle by cutting it or with a sharp blow.
- 14) Remove the tracheas. They are the white parts you can see after removing the cuticle.
- 15) Put another drop of physiological liquid. Take care to take off anything that could disturb the observation (pieces of cuticle, hairs...). If necessary, you can try to clean the brain by using a drop of physiological liquid that is directly cleaned with a precision paper towel.
- 16) By using the brush, put optical glue (preferentially the fluid one) around the hole of the strip.
- 17) Once the brain clean, put a drop of thick glue on the brain by using the minutien-pencil. Put another drop on the circular strip, centered and at 2/3-1/3.
- 18) Gently put the circular strip on the fly and make sure that the contact is made between the drop on the circular strip and the glue on the brain. Polymerise it with UV lamp (⚠ **use plastic glasses** ⚠).
- 19) Well done, your fly is ready if it is still alive! Bring it to the microscope!

Step 3: Calcium imaging

Materials:

- A well dissected fly
- 3D printed support
- Double-sided tape
- Whatman paper
- PBST
- Pheromone vehicle (Hexane and/or Ethanol)
- Pheromone (7T, cVA...)
- Pipettes
- Engineered apparatus
- LEICA confocal microscope
- USB key

- 1) On the 3D printed support, put 3 little pieces of double-sided tape on the dedicated places.
- 2) Cut 3 little pieces of Whatman paper and put each one on a piece of tape.
- 3) *Regarding the volatility of hexane and ethanol in air, this step should be done just before putting the fly under the microscope as much as possible.*
Otherwise, the concentration of the solution may change. Put a few drops of the solutions you want to test on the Whatman papers with different pipettes. It should always be put in the same order: 1) PBST; 2) Vehicle of the tested pheromone (mostly hexane and/or ethanol); 3) Pheromone. The concentration of these solutions may change, but make sure to make it consistent for a same fly.
- 4) Put the support in the apparatus, do the same with your well dissected fly.
- 5) **Check visually if fluo works through oculars.**

- 6) **Observe using confocal microscopy. For that, be sure to :**
 - **Turn OFF light if you checked visually (Risk: destroy the fluorophore by overactivation if both light and laser enlight the brain)**
 - **Activate the laser Argon in Config**
 - **Increase the laser power in Acquisition**
 - **Activate the green PMT and choose the appropriate values of the sensors.**
 - **Select your settings (xyt, line/frame averages...)**
- 7) Set the platform at its initial starting point and select the settings of the apparatus as follow:
 - Step: 6mm (The platform will move of 6mm...)
 - Period: 30s (... every 30s)
- 8) Navigate through the drosophila's brain and choose a nice view of your ROI. To improve it, you can change resolution, zoom in, focus on only one side. This will allow you to image and analyse more precisely and faster. Your picture should have very few saturated pixels before starting imaging.
- 9) **Push the start button on the apparatus**, start the record on the microscope software, the apparatus should move every 30s.
- 10) Well done, you did calcium imaging! You can save your work in the computer **(D: disk, users, crca, TRANNOY folder)** and in an USB key for further analysis!

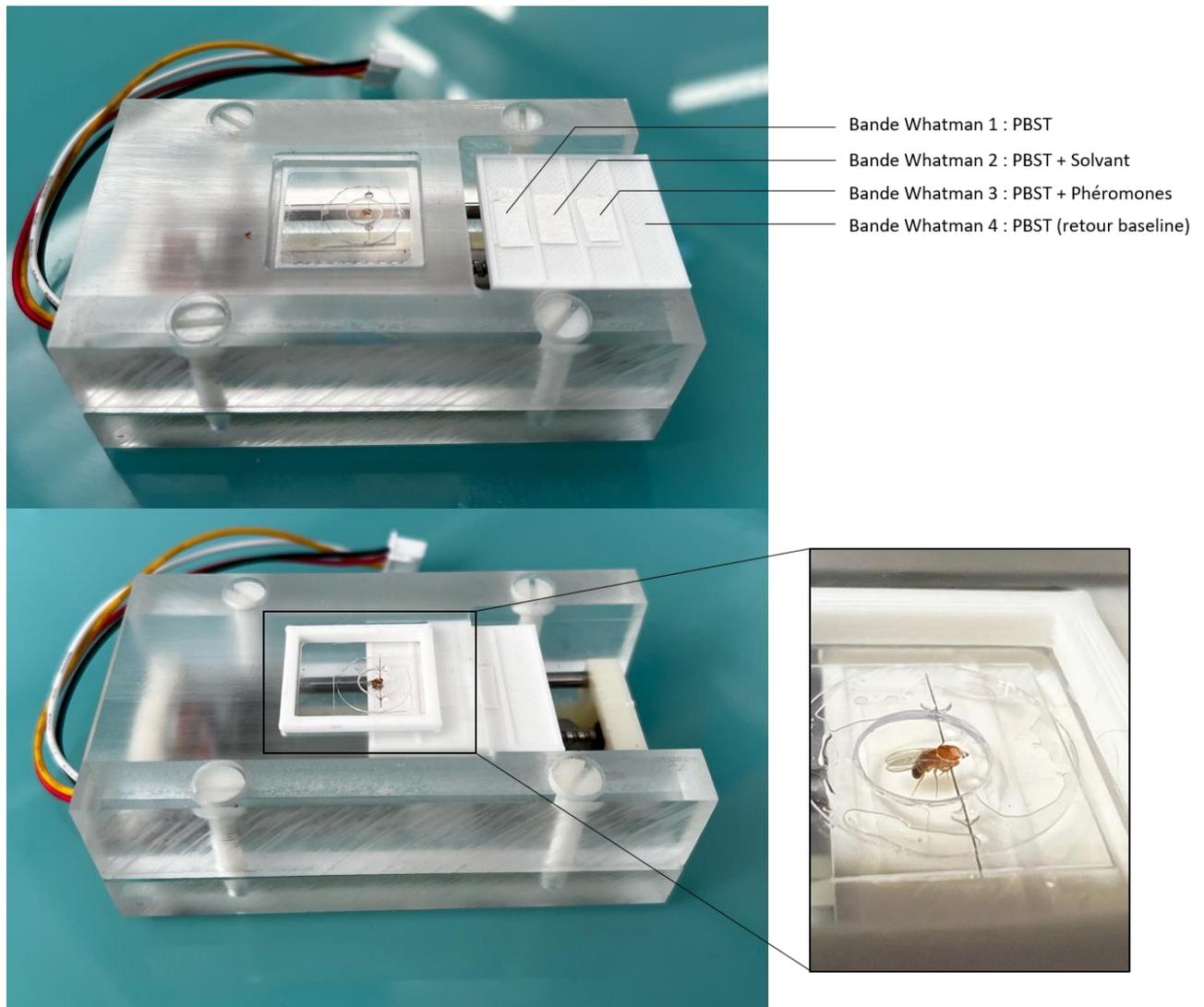
Step 4: Analysing calcium imaging data

- 1) Open your .lif files with Fiji software (drag & drop).
- 2) Select your ROI(s) with the selection tools (oval, rectangle, polygon, free hand...) to have a clear signal
- 3) Do a quick analysis by plotting the Z-axis profile ([Image>Stacks>Plot Z-axis profile](#))
- 4) Extract values ([Data>Save data as...](#)).
- 5) The file will be in .csv. Open with Excel and convert into "normal" table ([Data>Convert](#), choose the right separator and confirm). The first column will be the time, the second will be the mean value of the pixels.
- 6) Calculate the mean value of your baseline: select ~20-30 values for a short period of time during which values do not vary too much.
- 7) Normalize the mean column by the mean baseline you just calculated:
$$norm = \frac{Mean\ column \times 100}{Mean\ baseline}$$
 This convert the values in percentage of baseline, baseline being 100%.

Step 5: Tools to present nice pictures from your calcium imaging

- You can colour the video with Lookup Tables. To do so: [Image>Lookup Tables](#). *Fire* or *16 colours* are classically used, but feel free to choose another one, it is mostly aesthetic.
- You can play with the brightness and contrast to uniformize the background and see only the ROI being activated by the stimulation.
- If it is not enough, you can create a mask. Do a Z-projection of your film ([Image>Z-project](#)) and choose a relevant method. Then do a threshold ([Image>Adjust>Threshold](#)), tick "dark background" and set values in which your ROI fit correctly. If there is still some undesirable signal, then select them with a selection tool and clear them ([Edit>Clear](#)). You should have two values: 0 and 255. Divide these values by 255 so the mask won't modify the value of your video ([Process>Math>Divide](#)). Then apply the mask by using the image calculator ([Process>Image calculator](#)) and multiply your video by the mask.

Annexe 2 : Tapis roulant à phéromone pour imagerie calcique *in vivo*



Ce dispositif permet de présenter successivement à une drosophile 4 bande de papiers Whatman imbibé de différents produits : 1) du PBST (solution tampon), 2) un mélange PBST + Solvant pour contrôler la réponse de la drosophile au solvant dans lequel est placé la phéromone (*e.g.* hexane), 3) puis le PBST mélangé à la phéromone (7-T ou cVA). Une 4^e bande de PBST permettait le retour à la ligne de base (*baseline*) pour permettre le calcul de l'intensité de la réponse observée. A l'emplacement dédié à recevoir la lamelle où est fixée la drosophile, un petit cadre blanc (non rapporté dans la légende) pouvait être insérer dans le but de bloquer la lamelle et limiter les parasites dus aux tremblements du moteur. Le moteur pouvait être paramétré par un boîtier Arduino (non représenté) : l'amplitude du mouvement et le délai entre chaque mouvement pouvait être définis.

Titre : Comprendre l'agressivité : conséquences comportementales et mécanismes neuronaux régulateurs chez *Drosophila melanogaster*

Mots clés : agressivité, *Drosophila melanogaster*, neuroéthologie, Comportement social, Effet gagnant/perdant

Résumé : Les comportements sociaux agressifs et reproducteurs sont vitaux pour les individus. Ils permettent d'une part d'assurer l'accès aux ressources primaires comme de la nourriture ou des partenaires sexuels, et d'autre part ils assurent la production de descendance et la pérennité de l'espèce. Nous avons voulu comprendre comment les interactions agressives et leurs issues (victoire ou défaite) impactent le comportement reproducteur des mâles. Puis, nous avons voulu identifier les mécanismes fondamentaux sous-jacents à une dérégulation des comportements agressifs. Pour ce faire, nous avons exploité les avantages du modèle drosophile. Nous avons pu montrer que les perdants sont moins motivés une heure après leur défaite dans un contexte non compétitif. En compétition, ces perdants montrent de moins bons comportements reproducteurs qui ne sont pas dus à un défaut de perception de leur part ni à une préférence des femelles. Nous avons ensuite identifié deux acteurs neuronaux impliqués dans la dérégulation de l'agressivité : les VPM4 et MBON-11. Les VPM4 sont des neurones capables de double neurotransmission glutamate-octopamine, et nous avons montré que le glutamate permettait la régulation de l'agressivité. Celui-ci inhibe les MBON-11 via les récepteurs $\text{GluCl}\alpha$. L'activité induite par dTrpA1 des MBON-11 engendre des phénomènes de boxes, et nous avons mis en évidence que l'activité GABAergique de ces neurones en est responsable. Cette thèse constitue une première étape dans la compréhension de l'émergence des phénomènes hyperagressifs chez la drosophile, et pose la question des conséquences de cette dérégulation sur le comportement des individus.

Title: Understanding aggression: Behavioural consequences and neural regulatory mechanisms in *Drosophila Melanogaster*

Key words: Aggression, *Drosophila melanogaster*, neuroethology, Social behaviours, Winner/Loser effect

Abstract: Social aggressive and reproductive behaviours are vital for most animals. In one hand, they assure the access to primary resources such as food or mates. On the other hand, they assure offspring and species sustainability. Our aim was to understand how aggressive interactions and their result (victory or defeat) impact males' reproductive behaviours. Then, we studied the fundamental mechanisms underlying aggressive behaviours dysregulation. For such purposes, we used *Drosophila melanogaster* as a model. We showed that losers lack of motivation one hour after the defeat in non-competitive context. In competition, losers showed impaired courtship behaviours which are not the consequence of a misperception from the male nor a preference from the females. We then identified two neurons involved in the dysregulation of aggression: the VPM4 and the MBON-11. VPM4 are double-neurotransmitting neurons: they use both glutamate and octopamine as neurotransmitters. We showed that glutamate allowed the regulation of aggression. It inhibits MBON-11 through $\text{GluCl}\alpha$ receptors. dTrpA1 -induced activity in MBON-11 provoked boxing events to occur, and we demonstrated that GABA transmission from MBON-11 is responsible. This thesis is the first step in the comprehension of the emergence of hyper aggressive events in drosophila, and ask the question of the consequence of such dysregulation for individuals' behaviours.