

UNIVERSITE PARIS XIII – PARIS NORD
« U.F.R DES SCIENCES DE LA COMMUNICATION »

N° attribué par la bibliothèque:

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XIII

Discipline : BIOLOGIE DU COMPORTEMENT

présentée et soutenue publiquement par

Marie-Ange CHABAUD

le 6 novembre 2008

**DEVELOPPEMENT DE CONDITIONNEMENTS ASSOCIATIFS ET
EXPRESSION INDIVIDUELLE ET COLLECTIVE DE MEMOIRES
APPETITIVES ET AVERSIVES CHEZ LA DROSOPHILE**

Co-Directeurs de thèse :

Laure Kaiser-Arnauld

Thomas Preat

JURY

Pierre Jaisson	Univ. Paris 13 - Villetaneuse	Président du jury
Dominique Fresneau	Univ. Paris 13 - Villetaneuse	Examineur
Frédéric Mery	CNRS - Gif-sur-Yvette	Rapporteur
Frédéric Marion-Poll	AgroParisTech	Rapporteur
Jean-Christophe Sandoz	CNRS - Toulouse	Examineur
Laure Kaiser-Arnauld	INRA - Versailles	Co-directeur de thèse
Thomas Preat	CNRS - ESPCI Paris	Co-directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été financée de 2003 à 2006 par la bourse n° 9252 accordée par l'Ecole Doctorale Sociétés et Vivant, puis par un contrat à durée déterminée du CNRS de 3 mois en 2007, accordé par mon directeur d'équipe T Preat.

Je voudrais remercier avant tout le Master Biologie du Comportement et l'Ecole Doctorale Vivant et Sociétés pour la formation exceptionnelle qu'ils nous ont permis d'avoir et pour m'avoir donné la possibilité de faire ma thèse dans le domaine passionnant qu'est l'Ethologie.

Un grand merci également à Thomas Preat pour m'avoir accueillie dans son équipe, et pour son dynamisme et son enthousiasme scientifique communicatif.

Je ne pourrais jamais assez remercier Laure Kaiser pour son caractère remarquable, sa disponibilité, sa sérénité et son positivisme dans les moments où j'en manquais parfois...

Merci à Guillaume Isabel pour avoir bien voulu collaborer expérimentalement à la fin de mon projet n°3, et aux autres collègues anciennement ou encore présents dans l'équipe GDSM, Anne-Laure Belair, Niki Scaplehorn, Valérie Goguel, Vered Machluf, Guillaume Azarias, Benjamin Kottler, Julien Séjourné, Nicolas Gervasi, Michel Chaminade (alias Cham), Tazu Aoki, Julie Neveu, Vanessa Bourdet, que j'ai eu le plaisir de cotoyer durant ma thèse.

Certaines hypothèses et idées proviennent de discussions avec notamment Minh-Hà Pham Delègue, David Laloi, Jean-Marc Devaud, Jean-Christophe Sandoz, Frédéric Marion-Poll, Teiichi Tanimura, Vincent Fourcassier, Frédéric Mery, que j'ai eu le plaisir de rencontrer en diverses occasions de colloques ou réunions de travail.

Tout cela n'aurait pas pu être réalisé sans un appui technique. Merci au personnel de l'ancien atelier du LNCI et l'atelier de verrerie du CNRS de Gif pour la conception des différentes pièces du protocole ECP, Jean-Yves Tiercelin, Patrick Parra et Pascal Abbas de l'atelier de l'INAF pour leur professionnalisme et leur bonne humeur, Michèle et Jocelyne pour le service de cuisine des drosophiles et l'aide supplémentaire qu'elles nous ont apportée à la fin des expériences à l'INAF.

Enfin, merci aux directeurs Philippe Vernier (DEPSN) et Gérard Baux (NBCM) pour nous avoir laissé finir les expérimentations dans les locaux de l'INAF lors du réaménagement de l'équipe de Thomas Preat à l'ESPCI à Paris en 2006. Un grand merci à la fort sympathique équipe du NBCM, et notamment à Sabine De La Porte et Hua Yu pour notre colocation rat-drosophile réussie !

Merci également à la toute aussi sympathique équipe du LEGS, notamment à son directeur Jean-François Silvain pour avoir bien voulu m'accueillir dans ses locaux pour la rédaction de ma thèse, à Antoine Branca pour m'avoir initiée à la procédure GLM du logiciel « R » (système informatique *Linux*), et à Magally Torres pour les franches rigolades...

Et puis un grand merci à ma famille, mes amis biologistes ou non, ce serait trop long d'énumérer tout le monde, qui se sont intéressés à ma thèse et pour lesquels la drosophile n'est plus un mystère !

Et enfin, **Merci** !

à mon Vincent, pour son amour, sa patience durant les moments difficiles de la thèse, et tout simplement pour être là,

et à notre petite Louna, notre petit bonheur de tous les jours...

TABLE DES MATIERES

RESUME	13
--------------	----

AVANT-PROPOS

I. MES MOTIVATIONS POUR LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE.....	17
II. CONCEPT DE L'ETHOLOGIE.....	18
III. MON PROJET DE THESE.....	19

INTRODUCTION

I. GESTION D'UN PROJET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE : APPLICATION A LA MESURE EXPERIMENTALE DE L'APPRENTISSAGE ET DE LA MEMOIRE EN LABORATOIRE.....	23
1.1 Définition des objectifs du projet.....	23
1.2 Planification du projet.....	23
1.2.1 <u>Définition des sous-hypothèses de travail et des prédictions</u>	23
1.2.2 <u>Choix et développement des protocoles expérimentaux</u>	24
a) <i>Adaptation du protocole au modèle animal</i>	24
b) <i>Prise en compte de l'état motivationnel de l'animal</i>	26
c) <i>Méthodes de collecte des données: quelques problèmes types</i>	27
1.2.3 <u>Evaluation du temps et des ressources matérielles nécessaires aux expérimentations</u>	32
1.2.4 <u>Réalisation, suivi des expérimentations et diffusion des résultats</u>	32
II. LE CONCEPT D'UNIVERS PROPRE.....	33
III. APPRENTISSAGES ET MEMOIRES.....	33
3.1 Notions d'apprentissage.....	33
3.2 Notions de mémoire.....	35
3.3 Les modèles d'apprentissage de la psychologie expérimentale.....	37
3.3.1 <u>Apprentissages non-associatifs et associatifs</u>	38
a) <i>Apprentissages non-associatifs: habituation et sensibilisation</i>	38
b) <i>Apprentissages associatifs: conditionnements classique et opérant</i>	39
3.3.2 <u>Les apprentissages complexes</u>	41
a) <i>L'apprentissage discriminatif</i>	41
b) <i>La généralisation</i>	41
c) <i>L'apprentissage de règles logiques</i>	41

d) <i>L'apprentissage spatial</i>	41
e) <i>L'apprentissage social par observation et imitation</i>	42

IV. LA DROSOPHILE: MODELE EXPERIMENTAL POUR L'ETUDE DE LA MEMOIRE (GENETIQUE, NEUROBIOLOGIE ET COMPORTEMENT)..... 43

4.1 La force du modèle drosophile en laboratoire..... 43

4.1.1 <u>Relative simplicité du système nerveux: facilitation de l'étude des bases épigénétiques du comportement</u>	43
4.1.2 <u>Facilité d'élevage: un point fort pour la rapidité des investigations</u>	44
4.1.3 <u>Des outils génétiques très performants</u>	45
4.1.4 <u>La drosophile au service de la recherche médicale</u>	45

4.2 Caractérisation du contexte écologique de vie de la drosophile: une vie solitaire ou sociale chez la drosophile..... 45

4.2.1 <u>Caractérisation de son cycle de développement</u>	46
4.2.2 <u>Quelques notions sur la socialité</u>	47
4.2.3 <u>Interattraction et cohésion du groupe chez la drosophile</u>	48
4.2.4 <u>Mécanismes de cohésion du groupe</u>	48
a) <i>Communication sociale</i>	48
b) <i>Synchronisation sociale du rythme circadien</i>	50
c) <i>Régulation des comportements conflictuels au sein du groupe</i>	50
4.2.5 <u>Mémoire sociale chez la drosophile</u>	53
a) <i>Notions de mémoire sociale</i>	53
b) <i>Mémoire des mâles de leurs relations hiérarchiques</i>	54
c) <i>Sélection sexuelle chez les femelles: implication d'une mémoire sociale ?</i>	55
d) <i>Influence de l'expérience sociale sur le sommeil</i>	56
4.2.6 <u>Avantages de la vie en groupe chez la drosophile</u>	57
a) <i>Avantages au stade adulte</i>	57
b) <i>Avantages aux stades larvaires</i>	60
4.2.7 <u>Conclusion sur la socialité chez la drosophile</u>	62

V. DESCRIPTION GENERALE DU SYSTEME NERVEUX DE LA DROSOPHILE..... 64

VI. PARADIGMES D'APPRENTISSAGES ASSOCIATIFS EXISTANT CHEZ LA DROSOPHILE..... 68

6.1 Paradigmes liés à l'alimentation..... 69

6.1.1 <u>Conditionnement appétitif de préférences olfactives</u>	69
6.1.2 <u>Inhibition conditionnée du phototactisme</u>	70
6.1.3 <u>Inhibition conditionnée du réflexe d'extension du proboscis</u>	71

6.2 Paradigmes liés à la reproduction.....	72
6.2.1 <u>Inhibition conditionnée de la parade sexuelle.....</u>	72
6.2.2 <u>Conditionnement de préférence de sites de ponte.....</u>	73
6.3 Paradigme lié au contexte de vol: le conditionnement associatif visuel.....	73
6.4 Paradigmes de conditionnement aversif, à renforcements négatifs plus ou moins naturels.....	74
6.4.1 <u>Conditionnements olfactifs aversifs (choc électrique, mécanique ou thermique).....</u>	74
6.4.2 <u>Tâche d'apprentissage spatial.....</u>	74

VII. CAPACITES ET PROCESSUS MNESIQUES DE LA DROSOPHILE

DECOUVERTS A PARTIR DU CONDITIONNEMENT OLFACTIF AVERSIF..... 75

7.1 Les différentes formes de mémoire.....	75
7.2 Deux modèles de phases de mémoire.....	76
7.3 Description des processus mnésiques.....	78
7.3.1 <u>Phases d'acquisition et de mémorisation à court terme.....</u>	78
7.3.2 <u>Phase de stockage et de consolidation de la mémoire.....</u>	79
7.3.3 <u>Phase de rappel de la mémoire.....</u>	80

VIII. LIMITES DES METHODES D'INVESTIGATION ACTUELLES ET

PERSPECTIVES DE MON PROJET DE THESE..... 81

8.1 Non-généralisation des processus cognitifs en fonction des paradigmes de conditionnement.....	81
8.1.1 <u>Mémoire olfactive: spécificité des mécanismes en fonction du renforcement.....</u>	81
8.1.2 <u>Mémoire olfactive: spécificité des mécanismes en fonction des odeurs ?.....</u>	82
8.1.3 <u>Mémoire d'autres modalités sensorielles: spécificité fonctionnelle des structures cérébrales ?.....</u>	83
8.2 Développement de la technique d'imagerie pour l'investigation des circuits nerveux.....	84
8.3 Mesures individuelles ou en groupe des performances mnésiques chez la drosophile.....	86
8.4 Mon projet de thèse.....	88

MATERIELS ET METHODES GENERAUX

I. MATERIEL BIOLOGIQUE..... 91

1.1 Souches de drosophiles.....	91
1.2 Elevage.....	91

II. MATERIELS ET METHODES POUR LE PARADIGME D'EXTENSION

CONDITIONNEE DU PROBOSCIS.....	92
2.1 Préparation des individus à l'expérimentation.....	92
2.1.1 <u>Le sexe</u>	92
2.1.2 <u>La mise à jeun</u>	93
2.1.3 <u>La mise en contention</u>	93
2.2 Choix des stimuli conditionnel et inconditionnel.....	94
2.2.1 <u>Stimulus inconditionnel (SI)</u>	94
2.2.2 <u>Stimulus conditionnel (SC)</u>	95
2.3 Appareillage expérimental.....	96
2.4 Protocole de conditionnement et de test.....	97
2.4.1 <u>Phase de conditionnement</u>	97
2.4.2 <u>Phase de test</u>	99
2.4.3 <u>Définition de la réponse conditionnée</u>	99

III. MATERIELS ET METHODES DU PARADIGME DE CONDITIONNEMENT

AVERSIF.....	100
3.1 Préparation des individus à l'expérimentation.....	100
3.2 Stimuli inconditionnel et conditionnels.....	101
3.2.1 <u>Stimulus inconditionnel (SI)</u>	101
3.2.2 <u>Stimuli conditionnels (SC)</u>	101
3.3 Appareillage expérimental.....	101
3.3.1 <u>Dispositif de conditionnement</u>	101
3.3.2 <u>Dispositif de test</u>	102
3.4 Protocoles de conditionnement et de test.....	103
3.4.1 <u>Phase de conditionnement</u>	103
3.4.2 <u>Phase de test</u>	105
a) <i>Conservation des mouches après conditionnement</i>	105
b) <i>Conditions expérimentales du test</i>	105
3.4.3 <u>Mesure de la performance de mémoire</u>	106

IV. OLFACTOMETRE A 4 VOIES POUR TESTER LA MEMOIRE OLFACTIVE..... 106

4.1 Objectifs et avantages de l'utilisation de l'olfactomètre à 4 voies.....	106
4.2 Paramètres du test en olfactomètre.....	107

V. ANALYSES STATISTIQUES GENERALES..... 109

RESULTATS

<u>PROJET N°1 : CONDITIONNEMENT APPETITIF DE L'EXTENSION DU PROBOSCIS CHEZ LA DROSOPHILE</u>	113
I. RESUME DE L'ETUDE	115
II. PHASE DE MISE AU POINT	116
2.1 Différences non quantifiées liées au mode d'élevage ou au dispositif ouvert	117
2.2 Causes de l'activité spontanée du proboscis	118
2.2.1 <u>Hypothèse de l'excitation nerveuse centrale ou de la soif</u>	118
2.2.2 <u>Hypothèse du stress de la contention</u>	118
2.3 Amélioration de l'état physique des mouches	119
2.3.1 <u>Modification de la méthode d'induction de l'état de motivation alimentaire</u>	119
2.3.2 <u>Différentes souches de <i>Canton-Spécial</i> (CS)</u>	119
2.3.3 <u>Analyse de la mortalité en fonction des milieux de jeûne, de diète et des souches CS</u>	120
2.3.4 <u>Effets des changements de souche et diète sur les performances d'ECP</u>	121
2.4 Développement de différents types de conditionnement et de test	121
2.4.1 <u>Conditionnement ECP et réponse d'attraction en olfactomètre ?</u>	122
2.4.2 <u>Conditionnement ECP à double renforcement</u>	122
2.4.3 <u>Conditionnement ECP massé</u>	122
2.5 Standardisation du protocole et objectivité des observations: re-définition d'une réponse conditionnée	123
2.5.1 <u>Standardisation du protocole et travail en aveugle</u>	124
2.5.2 <u>Etablissement d'une échelle de l'extension du proboscis</u>	125
2.5.3 <u>Re-définition de la réponse conditionnée</u>	125
III. ARTICLE N°1: OLFACTORY CONDITIONING OF PROBOSCIS ACTIVITY IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	126
<u>PROJET N° 2 : CONDITIONNEMENT OLFACTIF APPETITIF DE L'ATTRACTIVITE CHEZ LA DROSOPHILE</u>	153
I. RESUME DE L'ETUDE	155
II. PHASE DE MISE AU POINT	156
2.1 Recherche d'un couple d'odeur neutre ou appétitif en olfactomètre à 4 voies et en appareil de test en T	156
2.1.1 <u>Recherche des concentrations auxquelles des odeurs aversives deviennent neutres</u>	156

2.1.2 <u>Comparaison de l'olfactomètre à 4 voies et de l'appareil de test en T: test de l'attractivité pour l'odeur de vinaigre de cidre.....</u>	157
2.2 Mise au point du test de la mémoire aversive en olfactomètre à 4 voies.....	159
2.2.1 <u>Un début difficile.....</u>	159
2.2.2 <u>Performances de mémoires aversives à court- et long-terme en olfactomètre à 4 voies en fonction de la concentration des odeurs.....</u>	159
2.3 Mise au point du conditionnement olfactif appétitif en groupe.....	160
2.3.1 <u>Conception d'un nouvel appareillage de conditionnement appétitif.....</u>	161
2.3.2 <u>Choix des paramètres de conditionnement appétitif.....</u>	161
2.3.3 <u>Protocole de conditionnement.....</u>	162
III. DELAI DE REALISATION DU DISPOSITIF DE CONDITIONNEMENT ET CONTRIBUTIONS DES DIFFERENTS PARTENAIRES A LA SUITE DU PROJET.....	162
IV. ARTICLE N°2: LONG-TERM MEMORY FOR ODOR-SUGAR ASSOCIATION FORMS IN ONE TRAINING SESSION IN <i>DROSOPHILA</i>.....	163
<u>PROJET N° 3: PERFORMANCES INDIVIDUELLES ET COLLECTIVES DE MEMOIRE OLFACTIVE AVERSIVE CHEZ LA DROSOPHILE.....</u>	181
I. RESUME DE L'ETUDE.....	183
II. PHASE DE MISE AU POINT: ADAPTATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES AU TEST INDIVIDUEL.....	184
2.1 <u>Choix de l'appareil de test.....</u>	184
2.2 <u>Adaptation de la luminosité à l'observation des mouvements des mouches.....</u>	184
2.3 <u>Choix des paramètres à observer pendant le test individuel.....</u>	185
2.4 <u>Méthode de comparaison des performances individuelles et en groupe.....</u>	188
III. ARTICLES N°3 et N°4.....	188
<u>ARTICLE N°3: SOCIAL FACILITATION OF LONG-LASTING MEMORY RETRIEVAL IN <i>DROSOPHILA</i>.....</u>	189
<u>ARTICLE N°4: CHARACTERISATION OF INDIVIDUAL OLFACTORY MEMORY PERFORMANCES IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>.....</u>	199
IV. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES: RECHERCHE DES MECANISMES DE L'EFFET POSITIF DU GROUPE.....	217
4.1 <u>Implication d'interactions sexuelles ?.....</u>	217

4.2 Implication de signaux visuels ?	219
4.3 Implication de signaux auditifs ?	220
4.4 Implication de signaux olfactifs ?	222
4.4.1 <u>Test d'attraction sur des mouches conditionnées</u>	223
4.4.2 <u>Test d'attraction/répulsion sur des mouches naïves</u>	224
4.5 Conclusion	227

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. DEVELOPPEMENT DE L'ECP CHEZ LA DROSOPHILE	231
1.1 Performances des drosophiles en ECP	231
1.2 Recherche des voies nerveuses de l'apprentissage de l'activité conditionnée du proboscis chez la drosophile	233
1.3 Possibilité d'application de l'imagerie calcique	234
 II. CONDITIONNEMENT APPETITIF DE LA PREFERENCE OLFACTIVE EN GROUPE	 235
2.1 Rôle de la répétition de l'apprentissage dans la mémoire appétitive à long-terme	235
2.2 Mécanismes de formation de la MLT appétitive et perspectives du projet	236
2.3 Généralisation des processus mnésiques pour différents contextes négatifs ou positifs	237
 III. PERFORMANCES INDIVIDUELLES ET EN GROUPE DE LA MEMOIRE D'UNE ODEUR AVERSIVE	 238
3.1 Caractérisation de la réponse conditionnée individuelle pour la MLT et la MRA	238
3.2 Effet positif du groupe pour la MRA et négatif pour la MLT	240
3.3 Perspectives expérimentales	240
3.4 Contribution des résultats pour les investigations de la mémoire chez la drosophile	242
3.5 Recherche des mécanismes du rappel de la mémoire	242
3.6 MRA et MLT: deux mémoires exclusives ?	243
 IV. LA DROSOPHILE: UN MODELE D'ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA SOCIALITE	 245
4.1 Des situations de stress comme force conductrice de l'évolution des comportements sociaux	245
4.2 Rapprochement vers les notions d' « apprentissage social » et de performance de « mémoire collective »	245

4.3 Utilisation de la drosophile pour l'étude de l'évolution de la socialité et pour l'étude génétique des comportements sociaux.....	247
V. CONCLUSION GENERALE.....	249
BIBLIOGRAPHIE.....	251
INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX.....	279
TABLE DES ABREVIATIONS.....	283
ANNEXES.....	285
ARBRE PHYLOGENETIQUE DES DROSOPHILES.....	287
CURRICULUM VITAE.....	288
ABSTRACT.....	292

RESUME

La drosophile est communément employée comme modèle expérimental d'étude de la mémoire, à partir d'un conditionnement aversif, utilisant les mouches en groupe. Pour comparer les processus mnésiques dans les contextes aversif et appétitif, nous avons développé deux conditionnements olfactifs appétitifs, celui de l'activité du proboscis chez la drosophile en contention, et celui de la préférence olfactive en groupe, avec l'obtention d'apprentissages associatifs, dépendants de la motivation alimentaire. Le premier, novateur, utilise des mouches en contention dans la perspective de l'utilisation de l'imagerie de l'activité neuronale *in vivo*. Le second produit de la mémoire appétitive à long terme, formée par des processus potentiellement différents de ceux de la mémoire aversive, en cours d'exploration. Ces travaux offrent la perspective d'approcher expérimentalement le contrôle motivationnel de la mémoire. Puis, par une analyse comparée des performances individuelles et en groupe de la mémoire aversive, nous avons mis en évidence des différences de comportements individuels entre deux formes de mémoire aversives consolidées connues chez la drosophile, la « mémoire à long terme » et la « mémoire résistante à l'anesthésie » (MRA), ainsi qu'une facilitation sociale de la performance de MRA, dont les mécanismes sont en cours d'étude. Ces résultats et une synthèse sur les études des comportements sociaux chez la drosophile permettent d'envisager la drosophile comme une espèce dotée d'une certaine socialité, et comme un modèle à inclure dans l'étude de l'évolution de la socialité.

DISCIPLINE : BIOLOGIE DU COMPORTEMENT

MOTS-CLES : *Drosophila melanogaster*, insectes, apprentissage, mémoire appétitive et aversive, olfaction, réponses conditionnées, comportements individuels, performances collectives, socialité.

Intitulé et adresse des laboratoires:

1) Laboratoire Développement, Evolution, Plasticité du Système Nerveux (DEPSN), CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

2) Laboratoire Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire (GDSM), CNRS UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

I. MES MOTIVATIONS POUR LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

La recherche fondamentale a toujours joué un rôle important pour la compréhension du monde qui nous entoure, qui nous a fait et qui nous fait évoluer, et vis-à-vis du grand public par le transfert des connaissances visant à l'évolution de la pensée et des mœurs. Je ressens une certaine fierté à m'être impliquée dans cette démarche, à une échelle aussi petite soit elle. L'homme a pris conscience de sa place parmi l'ensemble des formes de vie existantes sur terre par le biais des sciences fondamentales (environnement et univers). C'est dans le domaine comportemental qu'Aristote, plus de 300 ans avant J.C., a commencé à illustrer la continuité de la nature et à rapprocher les animaux et l'homme par leurs traces d'état d'âme et leurs capacités cognitives. Sous le titre « Psychologie des Animaux », il a écrit cependant qu'« aucun autre animal que l'homme ne possède la faculté de se remémorer » (voir Campan et Scapini 2002). La longue période du Moyen-âge n'aura pas été propice à l'évolution de la pensée scientifique, bloquée en grande partie par des dogmes anthropomorphiques et anthropocentriques; il a fallu attendre la révolution scientifique du XVIIe siècle débutée par Galilée, pour voir apparaître la démarche expérimentale en Science avec Descartes. A partir du courant philosophique prendront alors racine différents domaines dérivés de l'Ethologie, comme la psychologie animale expérimentale, le behaviorisme et la neurophysiologie du comportement, qui révéleront la richesse des capacités cognitives des vertébrés comme des invertébrés.

Cependant, dans l'environnement politico-scientifique actuel de la recherche en France, la recherche fondamentale semble largement délaissée. La recherche devrait servir exclusivement la cause humaine en s'adaptant à ses besoins immédiats, définis par des objectifs économiques ou de santé publique, et en laissant de côté les objectifs de revalorisation de la vie dans son ensemble et de l'équilibre de la biodiversité. L'étude des systèmes vivants dans leur environnement nous montre à quel point l'homme « civilisé » s'est écarté du principe d'équilibre. J'ai la profonde conviction que les sciences fondamentales en Ethologie ont encore un rôle important à jouer pour garder un esprit critique sur notre société actuelle et permettre l'évolution de nos mœurs.

II. CONCEPT DE L'ETHOLOGIE

L'Ethologie est l'étude biologique du comportement des animaux (y compris l'homme), ainsi que ses déterminants physiologiques, psychologiques et environnementaux (Campan et Scapini 2002). Elle a l'ambition de caractériser les manifestations motrices observables (comportement) d'un individu dans l'environnement où il se produit, par une approche expérimentale rigoureuse, en ciblant deux niveaux d'étude: le premier par l'induction et la description fine du comportement et le second par la recherche des déterminants du comportement de manière bipolaire, par l'étude de la causalité proximale et de la causalité ultime (Alcock 1993).

La causalité proximale étudie les déterminants internes et externes qui contrôlent le déclenchement du comportement. La recherche des déterminants internes inclut l'étude des déterminismes génétiques et épigénétiques, des mécanismes nerveux sensori-moteurs et de l'ajustement de l'état physiologique relatifs à la production du comportement. La recherche des déterminants externes s'intéresse aux stimuli du contexte environnemental déclencheurs du comportement.

La causalité ultime est la recherche de la fonction immédiate et de l'origine évolutive du comportement. Dans le cadre des théories de l'évolution, elle tend à replacer le comportement étudié en termes de stratégie comportementale de l'espèce, sélectionnée par le processus phylogénétique en raison des fonctions qu'elle assure de manière immédiate pour les individus (fitness et succès reproducteur) et en raison de la valeur adaptative qu'elle confère à l'espèce.

Les concepts et la recherche en éthologie ont évolué au cours des derniers siècles en privilégiant plus ou moins ces différents niveaux d'étude :

Jusqu'au milieu du 20^e siècle, l'éthologie se consacre essentiellement à l'observation des comportements, avec le courant des zoologistes et naturalistes qui les étudient dans leurs milieux naturels et s'intéressent particulièrement à leur causalité ultime (Buffon, Darwin, Fabre, Dorman, Spencer, von Uexküll, Heinroth) puis des psychologues et behavioristes qui investissent l'étude des comportements réflexes en laboratoire (Thorndike, James, Pavlov, Watson).

Puis au cours de la seconde moitié du 20^e siècle, la neurobiologie du comportement, liée à l'étude des causalités proximales, a connu une révolution, avec la volonté d'une partie des chercheurs issus de la psychologie comparée d'incorporer les techniques novatrices des études neurologiques à l'étude du comportement (Hebb, Hodgkins, Huscley). Les néo-behavioristes préfèrent au contraire garder une distance vis-à-vis des déterminants internes du comportement en les représentant comme une « boîte noire » et privilégient l'étude de la

plasticité du comportement dans une vision constructiviste (Skinner, Hull, Tolman). Enfin, les chercheurs de l'éthologie comparée moderne, restés proches du courant naturaliste, s'intéressent plus particulièrement à l'ontogénèse du comportement dans le cadre de la sélection naturelle et privilégient l'étude des comportements innés et de leur caractère adaptatif (von Frisch, Lorentz, Tinbergen, Hinde, Krebs, Davies).

L'éthologie d'aujourd'hui est explosée en un grand nombre de disciplines, mais reste majoritairement et concrètement bipolarisée, se focalisant soit sur l'étude des causalités proximales, soit sur la recherche des causalités ultimes. Cette bipolarisation a conduit à une scission relativement claire entre deux ensembles de chercheurs, utilisant des concepts et des méthodes propres à la neurophysiologie intégrative et aux investigations génétiques et épigénétiques dans le cas de la première causalité, à l'écologie comportementale et à la phylogénétique dans le cas de la seconde causalité. Pour comprendre le comportement dans sa globalité, il est cependant nécessaire d'intégrer ces différents champs d'étude, et d'articuler les différentes explications pour éviter de tomber dans le piège des intelligibilités uniques¹.

Aujourd'hui, ma propre conception de l'éthologie, influencée largement par ma formation de Master de Biologie du Comportement de Paris XIII et par mon expérience de thèse, est de favoriser cette approche intégrative du comportement pour faire le pont entre les disciplines.

J'ai ainsi eu la chance de m'impliquer dans ce processus durant ma thèse, par la volonté de mon laboratoire d'accueil d'acquérir une vision intégrative de son domaine de recherche, de favoriser l'interdisciplinarité et la diversification des points de vue et des démarches d'analyse.

III. MON PROJET DE THESE

Au cours de ma thèse au sein du laboratoire de T. Preat, je me suis intégrée à un projet de recherche dont le but général est d'étudier les mécanismes génétiques de l'apprentissage associatif et de la mémoire chez la mouche *Drosophila melanogaster*.

A partir d'un conditionnement a priori simple, mettant en jeu l'apprentissage d'une aversion olfactive, le laboratoire applique les multiples approches de génétique et de biologie moléculaire permises par ce modèle animal pour déterminer les séquences génétiques, les molécules et les structures nerveuses impliquées dans le processus de mémorisation. D'une manière générale, mon travail de thèse au sein du laboratoire a consisté à ajouter un point de vue éthologique à la démarche de l'équipe, en analysant plus finement le comportement utilisé et en développant de nouveaux outils comportementaux se rapprochant des conditions

¹ Voir à ce propos l'ouvrage « Les secrets du vivant: contre la pensée unique en biologie » de Michel Morange (Eds La Découverte, Paris).

naturelles et adaptées au modèle animal. L'apport de ces nouveaux outils dans l'étude des mécanismes mnésiques devait participer à deux objectifs principaux du laboratoire à plus ou moins long terme: le premier objectif est d'établir quels mécanismes sont généralisables ou dépendants de la situation expérimentale (contexte motivationnel et environnemental) en comparant les mécanismes dans différentes situations expérimentales. Le second objectif est l'apport d'un outil pouvant servir de base pour développer de nouvelles techniques d'investigation du système nerveux, en ciblant plus particulièrement celle de l'imagerie cérébrale.

Dans la première partie de l'introduction, je replace le travail de thèse comme un travail de gestion de projet, en faisant notamment le point sur la méthodologie que j'ai employée pour la définition, la réalisation et le suivi de mon projet de thèse.

Dans une seconde partie, je définis les concepts d'apprentissage et mémoire en me basant sur les exigences éthologiques et en remplaçant l'étude de l'apprentissage chez les insectes dans leur contexte actuel.

Dans une troisième partie, j'aborde la drosophile dans son système naturel pour faire un bilan (non exhaustif) de son répertoire comportemental. Puis je l'aborde comme modèle expérimental de laboratoire de l'étude de l'apprentissage et de la mémoire, où je décris les différents paradigmes de conditionnement associatifs existants, les bases génétiques et épigénétiques de la cognition qu'ils ont permis de découvrir chez la drosophile, ainsi que leurs avantages et leurs limites.

Puis en prenant en compte la diversité du répertoire comportemental, les bases des paradigmes existants et les objectifs du laboratoire, j'établis les objectifs et les démarches de mon projet de thèse.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I. GESTION D'UN PROJET DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE : APPLICATION A LA MESURE EXPERIMENTALE DE L'APPRENTISSAGE ET DE LA MEMOIRE EN LABORATOIRE

Cette partie consiste en une analyse de mon travail de thèse en termes de gestion de projet, une démarche que j'ai acquise au fur et à mesure de ma thèse. Cette analyse est inspirée de différentes campagnes d'information pour la valorisation de la Thèse, visant à favoriser l'insertion professionnelle des docteurs vers les métiers du privé et de l'entreprise en général.

1.1 Définition des objectifs du projet

La première étape consiste à définir et délimiter les objectifs du projet global, en fonction des bases existantes et des perspectives du travail dans le contexte scientifique, des objectifs propres aux commanditaires de l'étude (laboratoire d'accueil et/ou société de financement) et de la limite de temps allouée au projet.

La phase préliminaire de recueil des informations existantes sur le sujet, puis la veille continue durant la réalisation du projet, permettent de s'assurer de la nouveauté du travail et de l'optimiser en se servant des apports des études antérieures. La délimitation des objectifs permet également d'avoir un point de vue d'ensemble du projet nécessaire à sa mise en œuvre et à l'évaluation de son avancement au cours de la réalisation. Enfin, le temps est un facteur important à prendre en compte d'une manière générale, d'un point de vue compétitif pour ne pas perdre l'intérêt d'une étude face à d'autres laboratoires qui étudieraient les mêmes problématiques, et d'un point de vue plus positif et altruiste pour faire avancer la recherche, ou plus modestement pour apporter des nouvelles données au contexte scientifique qui pourront influencer et dynamiser les projets des autres laboratoires du domaine. Le temps est évidemment un facteur encore plus limitant dans le cas des contrats à durée déterminée (thèse, post-doctorat, etc...), le problème étant que cette limite n'est pas toujours adaptée à la réalité expérimentale de la recherche, où il est difficile d'évaluer tous les imprévus inhérents au fait de s'avancer dans l'inconnu.

1.2 Planification du projet

1.2.1 Définition des sous-hypothèses de travail et des prédictions

Les questions générales du projet doivent être redécoupées en un ensemble d'hypothèses pouvant être testées par des protocoles expérimentaux parcimonieux et apportant des résultats

facilement interprétables et non ambigus. Ainsi, lorsqu'on cherche à expliquer un phénomène, il est efficace de lister les différentes explications potentielles de la manière la plus exhaustive possible et de les tester une à une.

1.2.2 Choix et développement des protocoles expérimentaux

Pour répondre aux différentes hypothèses, il est nécessaire d'établir des protocoles expérimentaux sous un certain cahier des charges. Dans le cadre du développement de nouveaux protocoles d'apprentissages, un certain nombre de paramètres doivent être pris en compte: ils doivent être adaptés au modèle animal expérimenté et prendre en compte les limites liées à l'animal et au paradigme, tout en répondant aux perspectives des investigations pour le laboratoire et en respectant la législation en vigueur en terme d'éthique de l'expérimentation animale.

a) Adaptation du protocole au modèle animal

L'univers propre et le répertoire comportemental de l'espèce étudiée sont des aspects importants à prendre en compte par l'expérimentateur². Ainsi, contrairement aux idées développées anciennement par le néo-behaviorisme, les formes d'apprentissage que l'on peut développer avec une espèce donnée sont limitées par les caractéristiques propres à l'espèce et il est important de les prendre en compte dans la mise au point d'un nouveau conditionnement ou lorsqu'on souhaite prendre comme base un conditionnement déjà établi chez une autre espèce.

- adaptation du dispositif au répertoire comportemental du modèle animal

Cela nécessite d'adapter le choix du dispositif expérimental aux capacités motrices et au répertoire comportemental de l'espèce. Ainsi, le conditionnement opérant en cage de Skinner, mis au point chez le rat dans les années 1950, a nécessité quelques modifications du dispositif pour être utilisable chez d'autres modèles animaux tels que le hamster et le pigeon, en remplaçant le levier par un bouton sur lequel ces animaux pouvaient appuyer avec leur museau ou leur bec. Il est important de ne pas conclure trop vite sur des capacités médiocres d'apprentissage d'une espèce animale dans un certain paradigme tant que les conditions expérimentales ne sont pas optimisées pour cette espèce.

² Voir la définition de l'univers propre dans l'introduction, partie II « Le concept d'univers Propre ».

- prise en compte de la valeur adaptative du paradigme pour le modèle animal

En fonction de l'histoire évolutive d'une espèce, il est possible que certains processus cognitifs ne se soient pas développés du fait de leur manque de caractère adaptatif. Ceux-ci déterminent alors une certaine limite de flexibilité des comportements pour une espèce donnée en fonction des paradigmes d'apprentissage. Par exemple chez la fauvette, il serait possible de la conditionner à taper avec le bec sur un objet pour obtenir de la nourriture (motivation alimentaire) et à se balancer sur son perchoir pour obtenir un chant social (motivation sociale), mais pas de se balancer dans le cadre de la motivation alimentaire. Le processus d'acquisition serait en effet limité par un déficit de liaisons nerveuses entre les structures cognitives impliquées dans l'exécution du comportement de balancement et celles impliquées dans le traitement de l'information du renforcement appétitif (Hinde et Stevenson-Hinde 1973).

- définition des caractéristiques propres aux individus utilisés dans l'expérimentation

Il faut également prendre en compte la variation des répertoires comportementaux entre les différentes catégories d'individus au sein d'une même espèce. Par exemple, chez certaines espèces coloniales d'insectes où les individus possèdent des répertoires comportementaux différents en fonction de leur caste de travail, il a été démontré que le conditionnement appétitif par extension du proboscis est plus pertinent et fonctionne mieux chez les castes d'ouvrières que chez les castes des reproducteurs (reines et mâles) (Laloi 1999) et qu'il y a des différences de performance entre les ouvrières récolteuses de pollen et de nectar liées à des perceptions différentes de la récompense sucrée (Scheiner *et al.* 1999).

Chez d'autres espèces et plus généralement, il est important de tenir compte du sexe et de l'âge des individus (pour revue, voir Devaud 2003). En effet, il peut exister des différences comportementales, de capacités d'apprentissage ou de sensibilité aux situations expérimentales en fonction du sexe (papillon: Hartlieb *et al.* 1999; drosophile: Vaysse et Medioni 1973, Anholt et Mackay 2004; seiche: Jozet-Alves *et al.* 2008). Il est préconisé selon les cas d'études de n'utiliser qu'un seul des deux sexes ou d'analyser séparément leurs performances, au moins dans un premier temps, pour vérifier si elles sont significativement différentes. La plupart des expériences de cognition utilisent des individus jeunes, sachant que l'âge peut être à l'origine de diminution de performances de plasticité cognitive et comportementale, comme démontré par exemple chez la drosophile (Fresquet et Medioni 1993; Mery 2007).

b) Prise en compte de l'état motivationnel de l'animal

Dans le cadre de la théorie de l'évolution, l'apprentissage doit avoir également un bénéfice écologique en terme de fitness pour l'individu (ou pour sa descendance, voir même pour son groupe dans le cas d'une espèce sociale). Ainsi, l'apprentissage est limité par l'état motivationnel de l'individu.

- préparation de l'état motivationnel de l'animal

Dans le cas d'un conditionnement appétitif par exemple, il est nécessaire de mettre les individus en situation de motivation alimentaire, en les mettant à jeûner avant le conditionnement, pour que celui-ci engendre de l'apprentissage (voir par exemple, drosophile: Tempel *et al.* 1983; abeille: Friedrich *et al.* 2004). En système naturel, il a été également montré chez l'abeille que la motivation à apprendre et les performances d'apprentissage dans le paradigme d'extension conditionnée du proboscis (ECP) dépendent de leur motivation à répondre à l'eau et au sucre qui varie selon les saisons de fourragement et la quantité de la réserve dans la ruche pour les récolteuses de nectar (Scheiner *et al.* 2003, 2004).

La réponse comportementale conditionnée est également influencée par l'état motivationnel durant le test. Par exemple chez des guêpes parasitoïdes femelles (*Microplitis croceipes*) ayant subi un conditionnement appétitif à une odeur et un conditionnement à pondre à une autre odeur, l'état de motivation alimentaire durant le test conditionne la réponse à l'une ou l'autre odeur: lorsqu'elles sont en motivation alimentaire, les femelles répondent préférentiellement à l'odeur associée à la nourriture par rapport à l'odeur associée à la ponte (Lewis et Takasu 1990). Pour l'expérimentateur, il faut donc jouer sur la motivation et l'attention de l'individu avant et pendant l'expérience. Il peut être important également de tenir compte de la fluctuation de l'activité de l'animal au cours de la journée et au cours de l'année pour choisir à quel moment réaliser les expériences.

- choix des paramètres de conditionnement adaptés à la motivation

Il faut également jouer sur la pertinence des stimuli présentés à l'individu, en termes qualitatif et quantitatif (pour revue, voir Domjan 2005). Pour un conditionnement associatif appétitif par exemple, une solution plus ou moins concentrée en sucre, et le nombre et la durée de présentation de cette récompense n'auront pas le même effet sur les résultats d'apprentissage (abeille: Hammer *et al.* 1994; Scheiner *et al.* 1999, chien: Wagner *et al.* 1964). Le renforcement doit avoir une forte valeur motivationnelle, mais ne doit pas induire trop vite la satiété durant l'expérience. Il faut également faire attention à l'ordre d'apparition et à l'intervalle de temps (délai) séparant le début d'apparition des stimuli conditionnels et inconditionnels: un conditionnement obtient de meilleurs résultats si le début de présentation

du stimulus conditionnel précède de peu celui du stimulus inconditionnel, et se poursuit pendant la présentation de ce dernier (ou du moins, jusqu'au début).

- répétitions des essais de conditionnement

De plus, l'état d'attention de l'animal n'est souvent pas suffisant pour qu'il considère que cette association temporelle ait un caractère significatif s'il ne l'expérimente qu'une seule fois. Il faut donc répéter l'expérience pour que l'association prenne une valeur significative pour l'animal, et déterminer le nombre optimal de ces répétitions (pour revue, voir Campan et Scapini 2002).

c) Méthodes de collecte des données: quelques problèmes types

- la variabilité individuelle

Au sein d'une population, le comportement varie d'un individu à l'autre. Les sources de ces différences individuelles sont à chercher autant au niveau du génome qu'au niveau de l'expérience individuelle. L'hétérogénéité génétique des individus au sein d'une même population résulte par exemple des mécanismes de la dérive génétique au cours du temps et de la sélection artificielle, qui peuvent engendrer des différences de comportements par rapport à la population initiale. Des expérimentations de sélection artificielle de capacité d'apprentissage existent par exemple chez le rat sur une épreuve d'apprentissage en labyrinthe (Tryon 1940), et chez la drosophile sur des épreuves de conditionnement de préférence de sites de ponte (Mery et Kawecki 2002, 2004), de conditionnement olfactif aversif (Mery *et al.* 2007) et de conditionnement de l'excitabilité (Lofdahl *et al.* 1992).

De plus, chaque individu a sa propre expérience individuelle, qui se rajoute à l'univers propre de son espèce. Même chez les individus d'une souche isogénique (c'est-à-dire, avec le même fond génétique), le phénotype comportemental peut varier en fonction de variations environnementales.

Ces phénomènes sont à la base de la variabilité individuelle obtenue lorsqu'on mesure une donnée biologique. L'expérimentateur doit limiter cette variabilité individuelle en limitant les différences d'expériences individuelles avant l'expérimentation, en commençant par la standardisation des paramètres d'élevage (température, photopériode, nombre d'individus au sein du groupe d'élevage, etc...). L'élevage différentiel donne un exemple de l'importance de l'expérience individuelle sur le développement de l'individu: des individus élevés isolément, dans un environnement « pauvre », ont un développement plus lent et présentent une moins grande maturation nerveuse que des individus élevés en milieu « enrichi » (Rongeurs: Rosenzweig et Bennet 1977; drosophile: Heisenberg *et al.* 1995; Praag *et al.* 2000).

Mais il n'est pas possible de contrôler la diversité des expériences individuelles. Avant et durant l'expérimentation, chaque événement comportemental d'un individu dans une situation donnée (activité motrice, arrêt locomoteur et autres impacts sensoriels), même s'il ne conduit pas à une sanction gratifiante ou à une punition, peut contribuer à son expérience individuelle et avoir des conséquences sur son comportement ultérieur.

L'expérimentateur doit donc prendre en compte la variabilité des performances individuelles, en répétant l'expérience sur un certain nombre d'individus et en utilisant des individus différents pour chaque expérience. Il constitue ainsi un échantillon, pour lequel il calcule statistiquement les caractéristiques de l'individu moyen et de la variabilité inter-individuelle. Il doit avoir une idée de l'effectif nécessaire avant l'application du test statistique, en considérant les variations génétiques et environnementales (Anholt et Mackay 2004).

- constitution des groupes témoins

Pour savoir si l'expérimentation a un effet significatif sur les performances de notre échantillon d'individus, il faut pouvoir les comparer à celles d'un échantillon d'individus contrôles. Par exemple, dans le cadre d'un conditionnement associatif, si on souhaite vérifier l'hypothèse que l'apprentissage a une base associative, le lot d'individus conditionnés doit être comparé à un lot d'individus ayant reçu tous les stimuli et autres paramètres du contexte expérimental sauf l'association temporelle des stimuli potentiellement à l'origine de l'apprentissage ; si on veut vérifier l'effet d'une mutation génétique sur les performances de mémoire, il faut comparer les performances du lot conditionné mutant avec un lot conditionné « sauvage », etc...

- analyse statistique

Il est recommandé d'avoir une idée des analyses statistiques à utiliser dès la mise au point du protocole et la définition des groupes témoins, et de l'effectif nécessaire à l'application du test. En effet, on peut augmenter indéfiniment un effectif pour qu'un effet infraliminaire, apportant peu d'intérêt biologique, devienne significatif, avec la probabilité d'obtenir de « faux résultats positifs » ou de « faux résultats négatifs » (Anholt et Mackay 2004). Différents types d'analyses statistiques sont utilisées en fonction des hypothèses et des comparaisons à effectuer. Je mentionnerai celles que j'ai utilisées pour analyser les résultats présentés dans ce manuscrit dans la partie « Matériels et Méthodes Généraux ».

- constance et rigueur expérimentale

Il est primordial pour l'expérimentateur de garder constant l'ensemble des paramètres de l'expérience de la manière la plus rigoureuse possible, lors de la comparaison d'effets entre un lot testé et un lot contrôle, et même plus généralement lors de la reproduction d'une expérience. Dans des conditions naturelles, il est clair que le renforcement est largement plus complexe et composite que dans les conditions expérimentales. Au laboratoire, l'expérimentateur a tendance à considérer que les stimuli conditionnel et inconditionnel que l'animal perçoit sont simplement ceux qu'il administre, alors qu'ils peuvent être un ensemble prenant en compte les différents aspects subtils et contingents de la situation. On sait que l'animal est capable de focalisation sur certains stimuli comme critère fort de prévision parmi un ensemble de stimuli (potentiellement par effet de blocage ou de masquage de l'apprentissage³). Mais on ne peut pas savoir sur quels stimuli il se focalise réellement. Il a ainsi été démontré que les performances d'apprentissage et de mémoire peuvent être influencées par le contexte expérimental (voir par exemple, Lymnée: Haney et Lukowiak 2001; araignée *Phidippus princeps*: Skow et Jakob 2006).

- limitation de l'effet expérimentateur sur la mesure du résultat

En tant qu'observateur, l'interprétation des comportements et des résultats doit rester la plus objective possible. Cela nécessite tout d'abord de garder à l'esprit la différence entre notre univers propre et celui de l'animal étudié pour éviter les interprétations anthropomorphiques. Une mesure objective est facilitée par une quantification non basée sur l'interprétation. Ainsi, une performance d'apprentissage olfactif discriminatif peut être mesurée par le nombre d'individus présents à la fin du test dans chaque compartiment olfactif, comme c'est le cas pour certains paradigmes d'apprentissage chez la drosophile⁴. Lorsqu'une quantification basée sur l'interprétation est nécessaire, des tests en aveugle peuvent être utilisés lors de la prise de données durant l'expérimentation, pour que l'observateur direct ne soit pas influencé par les prédictions qu'on a fait des résultats. Il n'est cependant pas toujours possible de les réaliser, car cela nécessite deux expérimentateurs, un qui organise l'expérience et un qui prélève les résultats en aveugle. Enfin, en cas de difficultés d'interprétation des observations, il est nécessaire de vérifier si il existe des différences d'interprétation entre plusieurs observateurs (par exemple en faisant visualiser un enregistrement vidéo d'une même séquence comportementale à plusieurs observateurs) et de redéfinir des critères d'observation plus adaptés et communs.

³ Effets découverts par Kamin *et al.* et Rescorla *et al.* dans les années 1960-1970.

⁴ Voir dans l'introduction, la partie VI. « Paradigmes d'apprentissages associatifs existants chez la drosophile ».

- limitation de l'effet expérimentateur sur le déroulement même de l'expérience

En tant que praticien de l'expérimentation, il faut limiter les biais que l'on peut induire directement sur les comportements des animaux testés. Cela demande une grande capacité de rigueur expérimentale, en respectant rigoureusement le protocole et en restant le plus constant possible dans ses techniques, son comportement, ses humeurs et l'ensemble de ses caractéristiques physiques qui pourraient être perçus par l'animal et influencer l'expérience (par exemple, faire attention à la variation de nos odeurs corporelles lorsqu'on travaille sur un conditionnement olfactif !).

Un principe important à prendre en compte dans toute élaboration de protocole est d'invertir le sens temporel et/ou local des expérimentations et d'avoir toujours une situation réverse: par exemple si on compare plusieurs lots, il ne faut pas les tester toujours dans le même ordre pour ne pas avoir de biais temporel, et si on utilise deux dispositifs en même temps pour les tester, il faut inverser les lots sur les deux dispositifs, etc...

Cependant, il reste toujours un biais lié à l'expérimentateur, plus ou moins significatif (influence de caractéristiques physiques comme la force musculaire, de différents degrés de minutie, etc...). Il est nécessaire de prendre en considération le fait que l'expérience, même en laboratoire, est toujours réalisée dans un contexte particulier où certains éléments, non contrôlables par l'expérimentateur, peuvent influencer les performances comportementales des individus testés. Si on veut être sûr qu'un résultat a un caractère biologique fort et généralisable, indépendant de variations expérimentales non contrôlées, il est toujours possible de faire réaliser l'expérience par plusieurs expérimentateurs, dans des contextes expérimentaux différents (différents locaux ou laboratoires), mais en respectant de manière rigoureuse les paramètres du protocole.

- Ethique et expérimentation animale

L'éthique en expérimentation animale scientifique repose en grande partie sur les critères d'évaluation de la douleur et des capacités de conscience et d'intelligence de l'animal. Il reste difficile de définir des limites nettes du concept d'intelligence (Dennet 1998), mais les capacités cognitives peuvent être mesurées de manière concrète par les capacités de communication, d'apprentissage et de résolution de tâche, la présence d'un système nerveux centralisé, etc...

Les insectes, et les invertébrés d'une manière générale, ont longtemps été considérés comme des sortes d'automates dont le comportement était régi de manière mécanique, stéréotypée et programmée. Cette généralisation ne doit plus être de mise aujourd'hui, alors que de nombreux travaux démontrent l'existence de capacités cognitives complexes pour de plus en plus de modèles invertébrés (exemple de revue chez l'araignée, l'abeille et la

drosophile: Greenspan et van Swinderen 2004). S'il est maintenant admis que certains sont capables de représentations mentales, les capacités de méta-représentation (c'est-à-dire de conscience et de la pensée) ne leur sont pas encore accordées mais peuvent se poser comme hypothèse.

Dans les textes français et européens régissant l'expérimentation animale, il ne ressort aucune loi ou règlement protégeant les invertébrés. Cette exclusion pourrait être une négligence de taille dans la mesure où les invertébrés sont très utilisés en expérimentation. La ligue Française des Droits de l'Animal et certains chercheurs travaillant sur des modèles invertébrés ont récemment dénoncé cette carence de la législation, en appelant à ce que le domaine d'application des textes régissant l'utilisation d'animaux à des fins expérimentales soit étendu aux invertébrés dotés d'un système nerveux central (incluant donc les insectes et les céphalopodes entre autres)⁵.

La réglementation française sur l'expérimentation animale est basée sur l'autorisation des personnes et l'agrément des locaux. Toutefois, tout mauvais traitement ou acte de cruauté envers les animaux est interdit et les expériences scientifiques doivent être limitées aux cas de stricte nécessité (article 276 du Code Rural). Sans instaurer un système d'évaluation des expériences par des comités spécialisés, la réglementation française suppose donc que le chercheur procède lui-même à une évaluation de la nécessité de l'expérience qu'il se propose de réaliser au regard des contraintes qu'il va imposer aux animaux. Pour résumer⁶, le respect de cette législation implique (entre autres) le respect:

- de normes de collecte des animaux dans la nature en vue d'expérimentation,
- de normes liées à l'expérimentation, pour les conditions d'élevage (liées notamment à l'espace et au nombre d'individus), les interventions douloureuses ou de mise à mort (notamment l'obligation d'anesthésier l'animal avant toute dissection ou intervention douloureuse, sauf si l'emploi d'un anesthésique est nuisible à la procédure expérimentale et qu'il n'existe pas d'autre procédure pour répondre à l'hypothèse ne faisant pas intervenir la douleur)
- de normes concernant la relâche des animaux après expérimentation, ou au contraire du confinement des animaux transgéniques (adaptation des locaux pour empêcher leur sortie dans la nature et élimination par autoclavage après expérimentation).

Plusieurs revues (telles que *Journal of Comparative Physiology*) demandent également d'inclure sur les publications scientifiques une déclaration sur l'honneur que les

⁵ Colloque Ethique et invertébrés, 11 mars 2000.

⁶ Voir les directives du CNRS sur le site <http://ethique.ipbs.fr/sdv/expanim.html> et de l'INRA sur le site <http://www.inra.fr/internet/Produits/PA/an1999/num995/veissier/iv995.htm#chap3>, et pour aller plus loin, le volume « Bien-être, élevages et expérimentation » de la série « L'ethologie appliquée aujourd'hui » (Baudoin *et al.* 2003).

expérimentations animales effectuées au vue de la publication sont compatibles avec les lois en vigueur du pays où elles ont été effectuées.

1.2.3 Evaluation du temps et des ressources matérielles nécessaires aux expérimentations

A partir du protocole établi, l'expérimentateur peut calculer le temps nécessaire pour chaque expérimentation, en rajoutant une estimation de temps nécessaire pour recommencer des expérimentations en cas d'erreurs expérimentales, d'annulation de résultats ou tout simplement pour augmenter les effectifs. Cette planification en objectifs à court terme permet de maîtriser l'avancement ponctuel des travaux.

L'expérimentateur évalue de manière parcimonieuse et rassemble ses besoins en ressources matérielles pour l'expérimentation, telles que par exemple dans le cas de conditionnement les différents stimuli utilisés pour le conditionnement, les dispositifs de conditionnement et de test, la climatisation de la pièce expérimentale, le matériel d'enregistrement et de traitement des résultats (caméra, logiciel d'analyse du comportement, logiciels statistiques).

1.2.4 Réalisation, suivi des expérimentations et diffusion des résultats

Au cours de la réalisation des expérimentations, il est impératif de noter un maximum de détails pour savoir exactement ce qui a été fait, rester objectif, éviter les dérives entre le début et la fin de la collecte des données, pour reproduire l'expérience plus tard et construire des bases solides pour aller plus loin dans les investigations. Des essais préliminaires permettent de vérifier l'adéquation du protocole à la réalité de l'expérimentation, et le cas échéant, de le modifier en vue de l'améliorer.

Dans différents cas, il est possible de faire participer des stagiaires à son projet, pour l'aide à l'avancement du projet selon les niveaux et pour s'initier à l'encadrement⁷.

Enfin, la diffusion des résultats au sein des réunions d'équipe permet de promouvoir le retour des conseils et des différents points de vue, faire un point sur l'avancement du projet, et assurer la cohérence entre les différents projets de l'équipe en l'informant de résultats pouvant impacter les autres projets.

Pour finir, les résultats sont diffusés plus largement, dans le cadre de publication dans des revues spécialisées (de préférence internationales avec des impacts de lecture élevés...) ou de colloques scientifiques⁸.

⁷ Dans le cadre de ma thèse, le temps lié à l'encadrement complet de stagiaires n'aurait pas été raisonnable par rapport au peu de bénéfice lié à l'avancement des projets. Mais j'ai tout de même eu le plaisir de participer avec ma co-directrice de thèse Laure Kaiser à l'encadrement de deux stagiaires de niveau licence et collègue.

II. LE CONCEPT D'UNIVERS PROPRE

Un phénomène important à prendre en compte en science est la distinction entre le monde réel et le monde tel qu'un individu se le représente. En effet, l'univers propre d'un individu (c'est-à-dire du monde qui l'entoure et de son milieu interne) est dépendant des caractéristiques de son système sensoriel (capacités de vision, d'olfaction, de gustation, etc...) qui filtre les informations provenant de l'environnement. Elle ne peut donc informer l'individu que dans les limites de ses compétences. Ainsi, par rapport aux vertébrés en général, les photorécepteurs des insectes comme les abeilles et les drosophiles ne leur permettent pas de voir dans les couleurs rouges mais dans l'ultraviolet (Peitsch *et al.* 1992; Salcedo *et al.* 1999; Stach *et al.* 2004), et leur taux de vision séquentielle leur permet de mieux percevoir les mouvements et de réagir en fonction (Tammero et Dickinson 2002). Les caractéristiques générales du système sensoriel et moteur sont une propriété de l'espèce ou du groupe à laquelle l'espèce appartient, car elles sont définies en grande partie par les gènes. Cet univers propre à l'espèce, dont on doit le concept sous le nom de « Umwelt » à von Uexküll (1934), forment une base à partir de laquelle les individus de cette espèce peuvent analyser les événements et établir des réactions adaptées. Puis la représentation interne de cet univers devient propre à chaque individu, car elle évolue de manière individuelle par le jeu des apprentissages et autres expériences individuelles influençant la maturation du système nerveux.

III. APPRENTISSAGES ET MEMOIRES

3.1 Notions d'apprentissage (voir pour synthèse Dudai 1989a)

L'apprentissage est un mécanisme basé sur l'expérience individuelle à l'origine d'une modification de la représentation interne de l'environnement de cet individu, résultant d'un effet d'entraînement ou de renforcement, et pouvant conduire à une modification de son comportement pour l'adapter à son environnement. Plusieurs points de cette définition sont à remarquer:

- L'apprentissage permet l'adaptation d'un organisme à son environnement

Cette définition intègre le but adaptatif de l'apprentissage. Les individus apprennent à reconnaître et à réagir à des signaux essentiellement si cet événement est significatif pour leur

⁸ Voir l'article publié du projet n°1, et les articles en cours de révision ou en préparation de soumission pour les projets n°2 et 3, et en annexe mon CV citant mes participations avec communications orales ou affichées à différents colloques durant ma thèse.

fitness. Même si tous les signaux et évènements de l'environnement peuvent être perçus par l'individu, la plupart des messages ne sont pas conservés. Un mécanisme de filtrage où les informations sont triées, analysées et mises en ordre, permet aux évènements les plus significatifs de laisser des traces. Le caractère significatif d'un évènement est gradué, plutôt qu'en « tout ou rien ». Les informations retenues sont en général associées à une valeur renforçatrice, positive si elle augmente la probabilité d'expression du comportement à l'origine du renforcement, ou négative dans le cas contraire. Elles peuvent être « associées » à une absence de valeur renforçatrice dans les cas où l'apprentissage consiste à ne plus réagir à ces informations. Ces différents types d'apprentissages sont abordés plus loin⁹.

- Tous les apprentissages ne se matérialisent pas directement au niveau comportemental

La flexibilité des comportements individuels est une manifestation exemplaire de la fonction adaptative d'un apprentissage, par laquelle l'individu va se servir de son expérience pour adapter son comportement à l'environnement. Dans le courant behavioriste de l'éthologie, le comportement est considéré comme source et conséquence de l'apprentissage, avec par exemple la loi de l'effet de Thorndike et le développement des conditionnements opérants de Skinner¹⁰. Du point de vue d'un behavioriste, pour qui les mécanismes nerveux à l'origine de l'apprentissage et du comportement sont représentés comme une « boîte noire » où il n'a pas accès, un observateur peut découvrir que l'individu a appris seulement si l'individu apporte une manifestation de son apprentissage. Ainsi, la modification de la représentation interne doit induire une modification du comportement pour être mesurable.

Cependant, tous les apprentissages ne se matérialisent pas directement en un comportement particulier mais peuvent être à l'origine de traces infraliminaires. Certains apprentissages « latents » peuvent engendrer de simples modifications de la représentation interne et une meilleure organisation des connaissances, qui pourront avoir une influence sur les expériences ultérieures de l'individu. Par exemple, un rat affamé placé dans un labyrinthe complexe va apprendre à se repérer dans le labyrinthe même sans récompense alimentaire. Cet apprentissage n'est pas visible directement par l'expérimentateur. Mais lorsque on place une récompense alimentaire dans une zone du labyrinthe, ce rat apprend plus vite que des rats naïfs comment aller jusqu'à la récompense (Blodgett 1929). Ces apprentissages latents liés à la pré-exposition aux conditions expérimentales sont encore étudiés pour divers autres mécanismes chez le rat (Capaldi et Neath 1995; Stouffer et White 2005), et chez d'autres

⁹ Voir dans l'introduction, la partie 3.3 « Les modèles d'apprentissage de la psychologie expérimentale ».

¹⁰ Voir « *L'Analyse expérimentale du comportement* » de Skinner BF (1969), Ed. Mardaga, 3^{em} éd (1995), Broché, 406 p.

espèces comme la drosophile (Sitaraman *et al.* 2007). D'autres apprentissages pourront engendrer uniquement des modifications de latences de réactions préalablement existantes.

- L'apprentissage est individuel

L'apprentissage, même en contexte social ou reproduit à l'identique sur plusieurs individus, doit toujours être considéré comme une expérience individuelle, car les individus ne se représentent pas leur environnement et ne perçoivent pas leur expérience exactement de la même manière. En effet, en fonction de leurs expériences antérieures, la base de la représentation interne peut être différente et influencer sur les expériences ultérieures des individus. Ainsi, le jeu interactif et complexe entre maturation du système nerveux et expérience contribue à la différenciation interindividuelle. La variabilité individuelle implique pour un expérimentateur une méthodologie particulière d'analyse¹¹.

3.2 Notions de mémoire

La mémoire est la rétention durable de la représentation interne modifiée par l'expérience.

On considère généralement que la mémorisation passe par 3 étapes successives (pour revue, voir Campan et Scapini 2002):

- la mémoire immédiate : elle permet au sujet de garder à disposition momentanément l'ensemble des événements perçus, puis d'effectuer un certain filtrage pour ne garder en mémoire que les événements les plus significatifs.

- la consolidation : elle englobe les mécanismes visant à stocker la mémoire de manière permanente. Cette phase de consolidation conditionne la rétention à plus ou moins long terme des informations. On peut démontrer l'existence de mémoires à court terme et de mémoires consolidées par des expériences d'anoxie ou narcose qui suppriment le souvenir de l'évènement si la consolidation n'a pas encore eu lieu (mémoire à court terme) ou qui ne supprime pas le souvenir si la consolidation a eu lieu (mémoire consolidée) (*Caenorhabditis elegans*: Beck et Rankin 1995; drosophile: Tully *et al.* 1990; Folkers *et al.* 1993).

De même que les événements les plus significatifs sont appris, tous les apprentissages ne vont pas conduire à la consolidation, cela dépend de l'importance que l'individu aura accordée à cet apprentissage (motivation), et de la répétition de l'apprentissage. Ainsi, chez la drosophile et l'abeille par exemple, un cycle d'apprentissage conduit à de la mémoire labile à plus ou moins court terme, alors que la répétition de cet apprentissage conduit à de la

¹¹ Voir dans l'introduction, la partie 1.2.2 c « Méthodes de collecte de données: quelques problèmes types ».

mémoire consolidée (voir pour revues, abeille: Menzel *et al.* 2001; drosophile: Tully *et al.* 1990; Folkers *et al.* 1993). On considère souvent que la mémoire à court terme est une phase préliminaire à partir de laquelle se construit la mémoire consolidée. Il a été cependant démontré chez plusieurs espèces comme l'aplysie, le rat et l'humain que la mémoire consolidée peut se former même après une mémoire à court terme déficiente, ce qui suggère des mécanismes indépendants, non linéaires, pour ces deux formes de mémoire (aplysie: Emptage et Carew 1993; rat: Izquierdo *et al.* 2002; humain: voir pour revue Squire 1992). Cependant, ces mécanismes ne seraient pas généralisables, avec par exemple un lien direct entre l'extinction de la mémoire à court terme et l'extinction de la mémoire à long terme (rat: Cammarota *et al.* 2005).

- la stabilisation de la mémoire stockée: il s'agit d'un phénomène qui peut soit prolonger la consolidation, soit être de nature différente (Campan et Scapini 2002). Selon le mode de stockage, dépendant ou non de différents mécanismes de consolidation, il peut exister différents types de mémoires consolidées, plus ou moins stables dans le temps. La mémoire la plus stable est la mémoire à long terme (MLT), qui reste permanente durant une partie importante voir entière de la vie de l'individu. La consolidation et le stockage de la MLT sont liées à de la plasticité synaptique, mettant en jeu la synthèse de protéines pour développer et restructurer le réseau synaptique ou augmenter le nombre de récepteurs au niveau des boutons synaptiques. Chez la drosophile et l'abeille, on peut obtenir deux types de mémoires consolidées en fonction de la durée de l'intervalle séparant les répétitions de l'apprentissage. Après un conditionnement espacé, la consolidation / le stockage de la mémoire implique de la synthèse protéique, alors que la mémoire formée après un conditionnement massé ne l'implique pas chez la drosophile (Tully *et al.* 1994), et l'implique avec une certaine latence chez l'abeille (Menzel *et al.* 2001)¹². Il a également été démontré l'existence de différentes formes de mémoires consolidées chez l'aplysie (Mauelshagen *et al.* 1998), chez le crabe *Chasmagnathus* (Pedreira *et al.* 1998) et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Steidl *et al.* 2003).

Un certain nombre de travaux montrent que le sommeil, surtout le sommeil rapide paradoxal correspondant aux phases de rêve, joue un rôle important dans la consolidation / le stockage de la mémoire. Ainsi chez l'homme, il est intéressant de souligner que les phases de sommeil paradoxal, plus importantes au début de la vie, pourraient être corrélées aux fortes capacités de rétention des jeunes enfants (pour revue, voir Campan et Scapini 2002). Il est

¹² Pour l'abeille, cet effet différentiel de l'espacement des répétitions sur le démarrage d'un stockage par synthèse protéique n'est observé que pour la MLT « early » mesurée à 1 et 2 jours ; pour la MLT « late », mesurée à 3 et 4 jours, les conditionnements massés et espacés induisent tous les deux un stockage par synthèse protéique.

également reconnu, au moins chez l'homme, que le processus de mémorisation durant le sommeil produit une construction psychique en restructurant les informations en concepts (Ellenbogen *et al.* 2007) et favoriserait la perspicacité de la restitution de la mémoire (Wagner *et al.* 2004).

Enfin, la phase de restitution du souvenir (« le rappel » de la mémoire) permet à l'individu d'utiliser sa mémoire pour répondre de manière adaptée à un événement reconnu de son environnement.

Le rappel est une phase importante pour l'individu, car les phénomènes d'oubli, mesurés par la perte de l'adaptation du comportement, peuvent être associés à un déficit de restitution du souvenir alors que le souvenir est toujours stocké dans le cerveau (voir par exemple, Rat: de Hoz *et al.* 2004; homme: Warrington et Weiskrantz 1968). La restitution du souvenir est sensible au contexte expérimental (voir par exemple, Lymnée: Haney et Lukowiak 2001; araignée *Phidippus princeps*: Skow et Jakob 2006) et à l'humeur, aux émotions, au stress (voir pour revue Cammarota *et al.* 2004). De plus, il existe des mécanismes visant à l'actualisation et la reconsolidation du souvenir (Garelick et Storm 2005). Par exemple, si un individu reconnaît le stimulus qu'il avait associé à un événement et que cet événement n'apparaît plus, il va apprendre à ne plus répondre au stimulus et à ne plus associer le stimulus à l'évènement: ce phénomène est l'extinction de la mémoire.

La phase de rappel de la mémoire est également importante à prendre en compte pour un éthologue, car il ne peut pas observer les capacités d'apprentissage et de mémoire sans cette manifestation comportementale¹³. Pour obtenir une courbe de rétention, les performances sont mesurées au cours des différentes phases de la mémorisation par un test où on place l'individu en situation expérimentale de répondre à l'évènement qu'il a appris. Un individu ne peut pas être réutilisé plusieurs fois pour mesurer ses performances mnésiques aux différentes phases de mémorisation du fait de l'extinction de la mémoire durant le test.

3.3 Les modèles d'apprentissage de la psychologie expérimentale

D'une manière générale, on distingue deux types principaux d'apprentissages élémentaires, qualifiés de non-associatifs et d'associatifs, selon si un seul stimulus ou si plusieurs stimuli sont présentés de manière associée à l'animal. A partir de ces deux types d'apprentissages élémentaires peuvent se développer des apprentissages plus complexes, incluant les apprentissages discriminatifs, les processus de généralisation, la facilitation de

¹³ Cependant, voir Garelick et Storm (2005): le rappel doit être considéré également sans manifestation comportementale.

l'apprentissage par l'apprentissage, la reconnaissance spatiale, et les apprentissages sociaux (pour revue, voir Campan et Scapini 2002).

3.3.1 Apprentissages non-associatifs et associatifs

a) Apprentissages non-associatifs: habituation et sensibilisation

Dans les expériences d'apprentissage non-associatif, l'animal est exposé de façon répétée à un seul évènement. On parle d'habituation lorsque cet apprentissage conduit à la disparition momentanée de la réponse faite initialement par l'animal. Lorsque cet apprentissage conduit à une augmentation de la réponse initiale, en augmentant par exemple sa probabilité d'apparition, on parle de sensibilisation.

L'**habituation** est donc un apprentissage à ne pas répondre dont le renforcement est l'absence de sanction, puisque aucune ne lui est associée. Ce processus d'habituation est suffisamment élémentaire pour se retrouver à des niveaux extrêmement différents de l'arbre phylogénétique, depuis les protozoaires jusqu'aux insectes et les mammifères. L'aplysie est devenu un modèle classique de cette forme d'apprentissage en neuroéthologie, étudiée pour l'habituation de son comportement de rétraction des branchies sous l'effet de la répétition de stimulations tactiles du manteau ou du siphon. Si on change le site de la stimulation, l'aplysie répond à nouveau: cette restauration immédiate de la réponse est caractéristique de la déshabituatation. Si aucune autre stimulation n'est appliquée, l'inhibition de la réponse peut être maintenue jusqu'à plusieurs jours en fonction du conditionnement: la conversion d'une mémoire transitoire (à court terme) en mémoire à long terme requiert une répétition espacée (Kandel 1976; pour synthèse, voir Campan et Scapini 2002).

La **sensibilisation**, processus inverse de l'habituation, est un apprentissage qui entraîne une baisse des seuils de réponse à des stimuli initialement moins efficaces. Dans le cas de l'aplysie, une stimulation désagréable (par exemple un petit choc tactile) sur une partie du corps telle que la queue a comme effet une augmentation du réflexe de défense de l'animal vis-à-vis d'un grand nombre de stimuli appliqués ultérieurement au siphon, même quand il s'agit de stimuli neutres initialement. La durée de la mémoire dépend du nombre de répétitions de l'expérience douloureuse: quatre ou cinq de ces chocs espacés dans le temps au niveau du pied donnent naissance à une mémoire qui va durer plusieurs jours (Kandel 1976).

b) *Apprentissages associatifs: conditionnements classique et opérant*

Dans les expériences d'apprentissage associatif, les individus sont exposés à deux évènements mis en relation spécifique, et il en découle un changement de comportement.

Dans le cas du **conditionnement classique**, l'individu subit les deux évènements de manière involontaire. Le premier évènement est un stimulus inconditionnel (SI), perçut par l'animal comme positif ou négatif, auquel il réagit systématiquement par une réponse spécifique, appelée réponse inconditionnelle (RI). Le second évènement est un stimulus conditionnel (SC), normalement neutre, ou du moins, ne produisant pas la réponse inconditionnelle chez l'animal¹⁴. Le conditionnement classique consiste alors à présenter simultanément le SC et le SI, le début de la présentation du SC précédant celle du SI. Le résultat de l'apprentissage est que l'animal anticipe l'arrivée du SI en répondant directement au SC: la seule présentation du SC finit par déclencher la réaction inconditionnelle. Cette réaction obtenue après conditionnement est appelée réponse conditionnée (RC).

Un des modèles fondateurs bien connu du conditionnement classique est l'expérience faite sur le chien par Pavlov dans les années 1900, où le SI est l'administration de poudre de viande, qui conduit à une RI de salivation, et le SC un son de cloche (Pour revue, voir Campan et Scapini 2002). Après plusieurs présentations couplées des stimuli, le chien finit par saliver à la seule présentation du son. Le conditionnement classique a été ensuite développé chez les insectes, avec par exemple les conditionnements de l'extension du proboscis, olfactifs chez l'abeille (Takeda 1961; Bitterman *et al.* 1983) et gustatifs chez la mouche *Phormia regina* (Nelson 1971), et les conditionnements chez la drosophile de préférence ou d'aversion olfactive (Tempel *et al.* 1983; Tully et Quinn 1985) et de suppression de la parade sexuelle (Siegel et Hall 1979). Je reviendrai tout à l'heure plus particulièrement sur les différents conditionnements associatifs développés chez la drosophile¹⁵. En conditions naturelles, on trouve également des exemples de conditionnements associatifs dans les relations des nouveaux-nés avec leurs parents lors des activités de nourrissage: ainsi, les jeunes oiseaux nidicoles apprennent à anticiper la récompense alimentaire en ouvrant le bec directement à l'arrivée des parents, et les bébés humains en déclenchant le comportement de succion à la simple vue du biberon (pour revue, voir Campan et Scapini 2002).

¹⁴ Théoriquement, l'animal ne doit pas réagir initialement au SC. Cependant, il est souvent nécessaire que la réponse existe de manière infraliminaire ou latente, pour que l'animal soit capable d'y répondre de manière intensifiée après conditionnement. Dans ce cas, le conditionnement classique est nommé « conditionnement alpha » (Dudai 1989b).

¹⁵ Voir dans l'introduction, la partie VI. «Paradigmes d'apprentissages associatifs existants chez la drosophile ».

De telles situations où l'animal subit les événements passivement sont finalement peu fréquentes dans la nature: avec l'accroissement de sa mobilité au cours du développement, un animal va participer activement à son propre apprentissage, en apprenant à associer son activité motrice au caractère renforçateur de ses conséquences. C'est ce type d'apprentissage qu'utilise le **conditionnement opérant**, également appelé « instrumental », dont le modèle fondateur est le conditionnement du rat en cage de Skinner (voir Campan et Scapini). Le rat a accès à un levier sur lequel il peut appuyer avec la patte, et l'actionnement du levier est renforcé par une récompense alimentaire (délivrance de nourriture au niveau de la mangeoire). Les appuis sont produits de manière fortuite au départ, puis augmentent au fil de l'apprentissage. Le rat apprend alors très vite à associer le fait d'appuyer et de recevoir la nourriture, et finit par concentrer son activité entre le levier et la mangeoire.

Cependant, la catégorisation de différents paradigmes d'apprentissage en conditionnement classique ou opérant n'est pas toujours claire et reste discutée encore aujourd'hui (Dudai 1989b; Brembs 2003; Brembs et Plendl 2008).

D'une manière générale, la fonction écologique de l'apprentissage associatif est de permettre à l'animal de discerner et de rendre prévisible des relations de cause à effet, où les conséquences biologiques, directes ou indirectes, sont significatives. Un exemple assez marquant en contexte naturel est l'apprentissage des aversions alimentaires, où un animal subissant un désordre gastro-intestinal suite à l'ingestion d'un aliment, apprend à considérer cet aliment comme « mauvais » et à l'éviter ultérieurement (pour revue chez le rat, voir Ferreira 2004).

3.3.2 Les apprentissages complexes

a) L'apprentissage discriminatif

Ce type d'apprentissage met en jeu plusieurs types de conditionnements en même temps : il est possible par exemple de présenter deux (ou plus) stimuli conditionnels, et d'en associer un seul à un renforcement. Il y a donc à la fois apprentissage à répondre au stimulus renforcé (conditionnement associatif) et à ne pas ou plus répondre à d'autres stimuli (habituation).

Chez la drosophile, plusieurs conditionnements utilisent de l'apprentissage discriminatif, avec par exemple le cas d'un conditionnement olfactif aversif où deux odeurs sont présentées alternativement et une seule des deux est associée à des chocs électriques (Tully et Quinn 1985). Chez le rat, il existe des dispositifs d'apprentissage discriminatif visuel, semblables pour la plupart à des petits labyrinthes à deux ou plusieurs voies, où des signaux visuels perceptibles à l'entrée de chaque voie indiquent à l'animal la présence ou non d'une récompense alimentaire. Ainsi l'animal apprend à distinguer des formes géométriques, ou des

différences de position d'une même forme (triangle pointe en haut ou en bas), de coloration, etc... D'autres variantes encore plus fines de l'apprentissage discriminatif peuvent confronter un sujet à choisir entre deux signaux inégalement renforcés (en termes de probabilité de trouver le renforcement). Par exemple, la caille japonaise apprend à utiliser différentes stratégies selon les cas, soit en choisissant toujours le signal produisant le plus de renforcement (maximisation) soit en ajustant l'alternance des choix au pourcentage de renforcement des deux signaux (« *matching* ») (Pour revue, voir Campan et Scapini 2002).

b) La généralisation

Des processus de généralisation perceptive peuvent être mis en évidence à partir des apprentissages discriminatifs: par exemple, dans le cas de l'apprentissage à distinguer un triangle pointe en haut ou en bas, le rat va considérer comme significatif la position de la pointe, et généralise immédiatement cet apprentissage pour d'autres figures ressemblantes (triangle plein ou vide sur fond noir ou blanc, triangle sans base, etc...), qu'il arrive à discriminer par ailleurs. Des capacités similaires de généralisation existent chez de nombreuses autres espèces, des vertébrés jusqu'aux invertébrés, incluant les primates et l'abeille *Apis mellifera* (primates: voir les travaux de Davenport *et al.* dans les années 1970; pour revue, voir Campan et Scapini 2002; abeille: voir pour revue Benard *et al.* 2006).

c) L'apprentissage de règles logiques

Cette capacité d'apprentissage a été démontrée chez les singes macaque rhésus (Harlow 1949), et chez la pieuvre *Octopus* (Boal 1991). Lors d'un apprentissage discriminatif, l'animal améliore ses performances au fil des essais, puis au fur et à mesure des expériences, il apprend de plus en plus rapidement à résoudre les nouveaux problèmes de discrimination. Ce phénomène d'économie des essais implique l'apprentissage d'une règle logique, qui nécessite des capacités de catégorisation et de généralisation.

d) L'apprentissage spatial

Les apprentissages spatiaux ont été démontrés chez un très grand nombre d'espèces, des invertébrés aux vertébrés, où les individus apprennent à se repérer et se déplacer dans l'espace, 1) soit en utilisant principalement une localisation égocentrique et des informations kinesthésiques: c'est le cas si l'animal a appris qu'il fallait tourner à droite à un carrefour, et qu'il continue à tourner à droite même si on le place à un autre embranchement du carrefour, ce qui est utile pour les espèces comme la fourmi *Cataglyphis*, qui doivent se déplacer dans un biotope homogène fournissant peu de repères spatiaux (voir par exemple Wehner *et al.* 1996), 2) soit en utilisant une localisation géocentrique par la reconnaissance de repères

spatiaux: dans ce cas, l'animal saura reconnaître l'embranchement où il faudra tourner, comme par exemple pour la caille japonaise (travaux de Gallo 1969; pour revue, voir Campan et Scapini 2002). Ils peuvent ainsi apprendre à détourner leur locomotion ou à utiliser des raccourcis. A partir d'expériences de labyrinthe réalisées sur le rat (travaux de Tolman 1948; O'Keefe et Nadel 1978: pour revue, voir Campan et Scapini 2002), il a été également suggéré l'existence d'une carte cognitive, une représentation interne de l'espace dont l'animal peut se servir pour se déplacer à travers un labyrinthe lorsqu'il n'a plus accès à des repères spatiaux (sachant qu'il marque toujours une préférence pour la voie la plus courte disponible).

e) L'apprentissage social par observation et imitation

Chez nombre d'espèces, les relations sociales représentent pour les individus une source d'opportunités d'intégrer des informations sur le monde et d'enrichir leur répertoire comportemental de nouvelles compétences. Un individu peut ainsi éviter une expérience personnelle coûteuse en termes de fitness, en se servant de l'expérience de ses congénères.

Par observation et imitation des adultes, les jeunes font souvent l'apprentissage des comportements sociaux à adopter à l'âge adulte et les mettent en exercice par le jeu avec leurs parents ou d'autres jeunes (voir travaux chez le macaque rhésus *Macaca mulatta* de Harlow 1949, dans la revue de Campan et Scapini 2002). Les préférences alimentaires peuvent également être influencées socialement, un individu observant ses congénères manger une certaine nourriture, va être incité à consommer ou à augmenter sa consommation en cette nourriture (primates: Adnessi 2007; chauve-souris *Carollia perspicillata*: Ratcliffe et Ter Hofstede 2005). L'apprentissage de pratiques par observation des congénères a également été mis en évidence chez des espèces peu grégaires comme le poulpe, qui va préférer un objet face à un autre objet similaire mais de couleur différente après observation de congénères ayant appris à choisir cet objet par conditionnement (Fiorito et Scotto 1992). De nombreux cas d'apprentissages sociaux ont été démontrés également chez les insectes (pour revue, voir Chittka et Leadbeater 2005): les célèbres danses des abeilles, que les fourrageuses recruteuses utilisent comme description codée de la localisation et de la qualité de la source alimentaire, en font parties. Les bourdons facilitent leur recherche alimentaire en choisissant les espèces de fleurs que des congénères sont déjà en train d'exploiter et en évitant ainsi le coût d'une recherche individuelle (Worden et Papaj 2005). Le grillon des bois utilise également l'information sociale: lorsqu'il voit un congénère en comportement d'évitement d'un prédateur, il l'imité et maintient cette position de vigilance pendant au moins 24 h même en absence du prédateur (Coolen *et al.* 2005). Ce dernier exemple montre également que les apprentissages sociaux ne sont pas l'apanage des espèces les plus évoluées socialement car ils existent chez les espèces coloniales et non-coloniales (Coolen *et al.* 2005). Depuis longtemps,

il a même été suggéré qu'ils pourraient avoir lieu entre des individus d'espèces différentes (pour revue, voir Chittka et Leadbeater 2005).

Ces situations d'apprentissage complexe impliquent des processus cognitifs riches, qui échappent souvent à la simplification des situations expérimentales correspondant aux modèles classiques. Néanmoins, ces modèles sont une base nécessaire à la compréhension des mécanismes généraux (Campan et Scapini 2002), et leur recherche passe par de multiples approches et l'utilisation de différents modèles animaux. La drosophile est un organisme modèle présentant de nombreux avantages en science expérimentale de la cognition.

IV. LA DROSOPHILE: MODELE EXPERIMENTAL POUR L'ETUDE DE LA MEMOIRE (GENETIQUE, NEUROBIOLOGIE ET COMPORTEMENT)

Tout d'abord, je propose de visualiser rapidement pourquoi et comment la drosophile est devenue un animal modèle en science expérimentale. Puis je replace la drosophile *Drosophila melanogaster* dans son contexte écologique de vie, avec la caractérisation de son cycle de développement, sa place dans la phylogénèse, et une approche peu courante de son répertoire comportemental par la description de ses comportements sociaux et de ses capacités cognitives en situation sociale. Il est important de ne pas perdre de vue que les capacités d'adaptation du comportement aux contextes environnementaux sont dépendantes du répertoire comportemental de l'espèce, lui-même défini par le contexte écologique de vie de l'espèce. Je décris ensuite les principaux paradigmes d'apprentissage associatifs existants pour étudier en laboratoire la plasticité de certains des comportements de son répertoire. Enfin, je finis par décrire les différentes phases d'apprentissage et de mémoire étudiées à partir du conditionnement olfactif aversif et les bases neurales qui les sous-tendent.

4.1 La force du modèle drosophile en laboratoire

4.1.1 Relative simplicité du système nerveux: facilitation de l'étude des bases épigénétiques du comportement

Pour l'étude des mécanismes neurologiques du comportement, la drosophile a comme premier avantage d'avoir un système nerveux et un génome relativement simple, à mi-chemin entre les organismes modèles invertébrés « simples » comme les nématodes et l'aplysie, et les organismes complexes comme le rat et l'homme, associés à un répertoire comportemental assez étendu.

En effet, la drosophile est un insecte diptère de petite taille (de l'ordre de 2 à 4 mm de long) possédant un cerveau composé de peu de neurones et de synapses par rapport à d'autres organismes plus complexes (environ 100 000 neurones chez la drosophile, tous unipolaires contrairement aux vertébrés, et 1 million de fois plus de neurones chez l'homme), mais dont le fonctionnement suit les mêmes principes fondamentaux que chez les mammifères. La drosophile possède néanmoins un répertoire comportemental étendu (vol, marche, parade nuptiale, réflexes moteurs, rythmicité de 24 h, etc..) et les différents paradigmes d'apprentissages qui ont pu être développés¹⁶ montrent qu'elle est capable de flexibilité et d'adaptabilité du comportement.

La simplicité du système nerveux et du génome permet des approches de génétique inégalées chez les mammifères, et qui permettent de moduler les circuits nerveux. La plupart des voies de signalisation guidant les processus basiques de développement sont restées intactes entre Vertébrés et Invertébrés après 700 millions d'années d'Evolution (Rubin *et al.* 2000).

Ainsi, des processus cognitifs complexes et relativement conservés dans l'évolution comme la mémoire, sont décryptés beaucoup plus facilement chez des organismes plus simples comme la drosophile, et l'apport de ces informations permet de compléter et d'accélérer les investigations chez les Vertébrés.

4.1.2 Facilité d'élevage: un point fort pour la rapidité des investigations

A cela s'ajoute la facilité d'élevage de la drosophile en laboratoire. Sa petite taille permet un élevage de centaines de lignées dans un espace restreint. Son nourrissage est simple, avec l'utilisation d'un milieu alimentaire standardisé (maïs, levure, sucre et agar). Sachant que *Drosophila melanogaster* est une espèce d'origine tropicale, elle peut être élevée à une température d'élevage stable (dans des étuves climatisées) et être utilisée dans les expérimentations de manière uniforme durant toute l'année. Son cycle de génération est court, contrôlable en fonction de la température d'élevage (développement de l'œuf en imago en 10-12 jours à 25°C, 3 semaines à 18°C) et permet d'obtenir un grand nombre de descendants à chaque génération (Fig. 1). Ce temps de génération est plus rapide que celui de la souris par exemple (qui de plus est en âge de se reproduire vers 6-8 semaines, contre seulement 8-12 heures chez la drosophile), et permet donc une plus grande rapidité des investigations.

¹⁶ Voir dans l'introduction, la partie VI. « Paradigmes d'apprentissages associatifs existants chez la drosophile ».

4.1.3 Des outils génétiques très performants

Chez la drosophile, contrairement à d'autres insectes plus gros (criquet, abeille..), il est techniquement plus difficile d'utiliser des approches électrophysiologiques pour étudier les structures impliquées dans la plasticité comportementale. Par contre, les approches génétiques et de transgénèse, débutées essentiellement dans les années 1980, ont été favorisées et ont connu des progrès spectaculaires depuis le séquençage du génome de la drosophile (Adams *et al.* 2000). Cela a conduit à la création d'une banque de données moléculaires et génétiques permettant d'analyser les fonctions des gènes. En parallèle, des outils de manipulations génétiques performants ont été également développés, tels que les techniques de transgénèse permettant l'expression génétique dirigée et l'expression ectopique de gènes, et les techniques de larges criblages de mutants, qui ont permis de caractériser de nombreuses mutations aux effets moléculaires ou structuraux.

4.1.4 La drosophile au service de la recherche médicale

L'achèvement du séquençage du génome humain (entre 2000 et 2003) a ouvert la voie à l'identification systématique des gènes impliqués dans les maladies humaines. Cependant, il est souvent difficile de comprendre la fonction du gène sans utiliser un modèle animal expérimental. La drosophile possédant environ 75% d'homologie génétique avec l'homme pour les gènes responsables de maladies (Reiter *et al.* 2001), elle est maintenant utilisée comme modèle de maladies humaines ayant un lien avec la génétique, comme c'est le cas par exemple pour les maladies de Parkinson, de Huntington, d'Alzheimer, le cancer et les retards mentaux (Didelot 2006).

4.2 Caractérisation du contexte écologique de vie de la drosophile: une vie solitaire ou sociale chez la drosophile ? ¹⁷

La drosophile (droso = rosée, phile = qui aime) est également appelée communément « mouche du vinaigre » pour son attirance envers les produits fermentés. Elle a une alimentation très variée, se nourrissant sur les fruits et légumes fermentés, les végétaux et champignons en décomposition, et les liquides fermentés et sucrés.

Il existe différents groupes et espèces de drosophile (voir en annexe, Fig. 30). L'espèce la plus communément utilisée en laboratoire, *Drosophila melanogaster* du groupe melanogaster, est une espèce d'origine tropicale (Afrique de l'est), qui a subi une répartition globale

¹⁷ Cette partie fait l'objet d'une revue en préparation pour soumission, mais qui n'a pas été insérée dans la thèse pour éviter une redondance de lecture (voir CV en annexes).

probablement à cause des activités humaines, et dont l'abondance est corrélée au niveau d'urbanisation des régions (Avondet *et al.* 2003; Keller 2007).

4.2.1 Caractérisation de son cycle de développement (Fig. 1)

C'est un insecte holométabole: après l'éclosion de l'œuf, son développement larvaire comprend trois stades et est caractérisé par une forte activité alimentaire. Puis la larve de dernier stade arrête de manger, s'immobilise et forme une pupa. La pupa subit alors une métamorphose (transformation complète) transformant progressivement son organisme larvaire en organisme adulte. A l'émergence, l'imago recommence à s'alimenter. Il passe encore par une phase de 8 à 12h d'immaturité où son système nerveux finit de se développer, puis le nouvel adulte devient sexuellement mature et s'engage dans la reproduction.

Les drosophiles ont une stratégie de reproduction de type itéroparité (par opposition avec la stratégie de semelparité; pour revue, voir Costa 2006), c'est à dire que les femelles se reproduisent plusieurs fois au cours de leur cycle de vie et pondent des œufs en grande quantité à différents endroits et à plusieurs périodes de temps. Cette stratégie se base sur le fait que la probabilité de survie d'un adulte est plus élevée que la probabilité de survie d'un individu de la progéniture. Le temps de génération est court (environ 10 jours à 25°C), et le mode de reproduction induit un grand nombre de descendants à chaque génération.

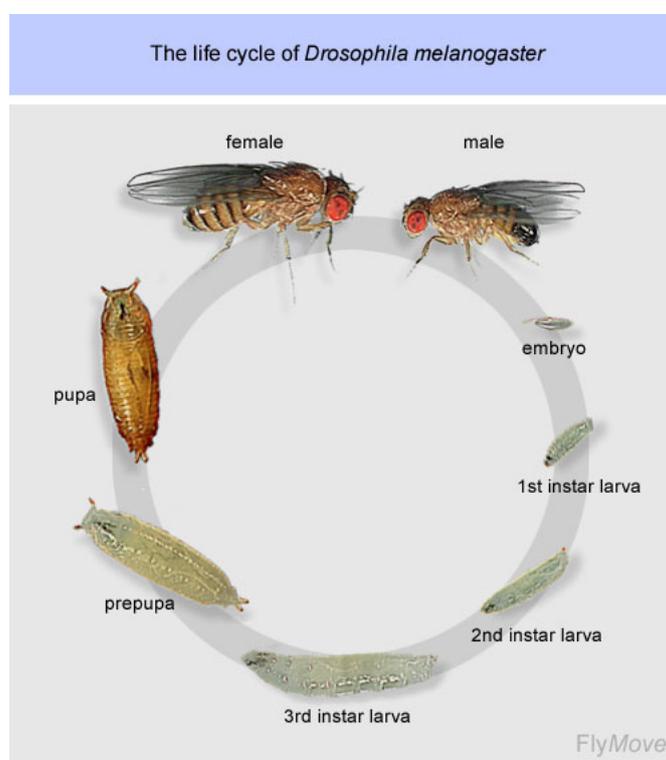


Figure 1: Cycle de développement de *Drosophila melanogaster*. Le temps de génération est d'environ 10 jours à 25°C, avec environ 1 jour d'embryogénèse, 1 jour en premier stade larvaire, 1 jour en second stade larvaire, 3 jours en troisième stade larvaire, et 5 jours en stade pupal (Source: FlyMove, <http://flymove.uni-muenster.de/Genetics/Flies/GeneFliespage.html>).

4.2.2. Quelques notions sur la socialité

Les interactions sociales sont définies par les interactions entre au moins deux organismes de la même espèce, en prenant en compte les différents comportements et l'échange mutuel des stimuli qui les régulent du début jusqu'à la fin de l'interaction (Fuller et Hahn 1976). Cette définition de Fuller et Hahn inclut les interactions de type sexuel. De nombreux types de comportements sociaux existent chez des espèces de différents niveaux de socialité. Chez les espèces solitaires, les individus interagissent entre eux seulement pour la copulation, et chez les espèces eusociales, qui vivent en sociétés hautement structurées, quasiment toutes les activités sont influencées par les interactions et la coopération entre les individus (Wilson 1975; Jaisson 1985). Les limites inférieures de la socialité restent cependant assez floues. Chauvin, en 1963, caractérise le premier niveau de la socialité par une inter-attraction entre congénères indépendamment du sexe (voir Campan et Scapini 2002). Cette définition exclut de la socialité les regroupements grégaires d'individus liés à leur attirance commune pour les mêmes conditions écologiques. Pour Wilson (1975), les espèces peuvent être caractérisées de sociales seulement si elles sont organisées sur un mode coopératif. Jaisson (1985) a proposé des niveaux intermédiaires de socialité en fonction du niveau de coopération. La vie solitaire est alors caractérisée par l'*égoïsme*, les niveaux intermédiaires de socialité par le *mutualisme*, et la vie eusociale par l'*altruisme*. Parmi les niveaux intermédiaires, les insectes subsociaux, tels que les scarabées et les *Copris* (bousiers), montrent de la coopération pour les soins aux jeunes, et les insectes semi-sociaux, tels que certaines espèces d'abeilles et de guêpes, sont organisés en groupes communaux avec plusieurs femelles mais sans spécialisation en castes comme chez les insectes eusociaux (pour revue, voir Campan et Scapini 2002).

Cependant, ces terminologies ont été définies selon les critères clés qui définissent l'eusocialité, et les arthropodes des niveaux intermédiaires de socialité ont été largement ignorés ou relégués à des statuts en marge des définitions (Milliser and Uetz 2007). Récemment, James T. Costa a réintégré un certain nombre de ces espèces parmi les espèces sociales dans son livre *The Other Insect Societies* (2006), où il approche la socialité plus en terme de contextes écologiques et de comportements sociaux, qu'en terme de classification en structures sociales. Wertheim *et al.* (2005) avaient déjà eu une démarche un peu similaire pour différents arthropodes, mais qu'ils considéraient comme solitaires.

Depuis longtemps, les drosophiles adultes sont connues pour vivre de manière plus ou moins grégaire, s'agrégant en petits groupes sur les patches de nourritures, où les individus s'alimentent, se reproduisent et déposent les œufs (Jaenicke and James 1991; del Solar 1998; Lefranc *et al.* 2001; Wertheim *et al.* 2006; Takahashi 2006). Mais comme pour d'autres arthropodes connus pour s'agréger et pour lesquels plusieurs bénéfices à ces agrégations ont été trouvés, la vie en groupe des drosophiles n'a jamais été caractérisée de vie sociale

(Prokopy et Roitberg 2001; Wertheim *et al.* 2005), au contraire plusieurs chercheurs ont même affirmé que les drosophiles appartiennent aux espèces solitaires et s'en servent comme outil de comparaison avec des espèces sociales, telles que l'abeille *Apis mellifera*, pour comprendre les mécanismes propres à la socialité (Robinson et Ben Shahr 2002; Nelson *et al.* 2007; Predel et Neupert 2007; Amdam *et al.* 2007). Pour Robinson et Ben Shahr (2002), la raison principale est que la copulation serait la seule activité chez la drosophile connue pour impliquer des interactions structurées entre les individus, et qu'un regroupement lié à la copulation n'est pas un critère de socialité (Chauvin 1963: voir Campan et Scapini 2002; Wilson 1975).

Depuis quelques années cependant, des travaux ont montré que pour différentes espèces de drosophile, les interactions sociales au sein d'une population ne se limitent pas à la copulation, et que les individus ne sont pas indépendants et participent à la cohésion du groupe.

4.2.3 Interattraction et cohésion du groupe chez la drosophile

Premièrement, cette agrégation n'est pas seulement liée à de l'attraction sexuelle ou à de l'attraction pour les mêmes conditions écologiques, puisque l'agrégation est également observée indépendamment du sexe (Lefranc *et al.* 2001) et dans des conditions de ressources homogènes (Wertheim *et al.* 2006; Takahashi 2006). L'agrégation est donc également due à de l'interattraction entre les individus, basée sur la production d'une phéromone d'agrégation attirant aussi bien les mâles que les femelles (Bartelt *et al.* 1985; Wertheim *et al.* 2006).

Deuxièmement, cette agrégation est maintenue durant les passages entre différents patches alimentaires (Lefranc *et al.* 2001; Tinette *et al.* 2004), ce qui suggère que la cohésion du groupe sur un patch dépasse la simple agrégation liée à la prise alimentaire et à la copulation, et que des interactions plus complexes peuvent apparaître entre les individus du groupe.

4.2.4 Mécanismes de cohésion du groupe

a) *Communication sociale*

Les interactions sociales chez la drosophile peuvent impliquer des signaux visuels, auditifs, tactiles et olfactifs. La seule phéromone volatile, perceptible à distance, identifiée jusqu'à présent chez les espèces de drosophile du groupe *melanogaster* est le (Z)-11-octadecenyl acetate, également nommé 11-*cis*-vaccenyl acetate (cVA) (Bartelt *et al.* 1985; Symonds and Wertheim 2005). La cVA est un lipide spécifique des mâles, produit dans leur appareil génital, et qui est transmis aux femelles sexuellement matures durant la copulation. Cette phéromone est connue depuis longtemps pour induire des comportements d'agrégation

chez les mâles et les femelles (Bartelt *et al.* 1985; Xu *et al.* 2005). Les femelles transfèrent également la cVA dans les sites d'oviposition durant le dépôt des œufs, ce qui permet aux autres femelles de détecter les sites préexistants et de déposer leurs œufs « en nid » dans ces mêmes sites (Bartelt *et al.* 1985). L'effet agrégatif de la phéromone est transmis au cerveau de la mouche par une voie spécifique, identifiée en détail récemment (Xu *et al.* 2005; Ha and Smith 2006)¹⁸.

La cVA est également impliquée dans les comportements reproducteurs, favorisant la copulation chez les femelles (Antony and Jallon 1982; Kurtovic *et al.* 2007) et de manière étonnante, en agissant comme une phéromone aversive pour la copulation chez les mâles (Kurtovic *et al.* 2007; Ejima *et al.* 2007). Kurtovic *et al.* (2007) ont montré que la perception de la cVA inhibe la parade sexuelle chez les mâles qui ont subi des rejets de femelles déjà fécondées. Cet effet aversif de la cVA est transmis au cerveau par une voie spécifique et différente de l'effet agrégatif (Ejima *et al.* 2007; pour revue sur la perception de la cVA, voir Benton 2007)¹⁹.

Cet ensemble de résultats met en évidence le rôle ubiquitaire de la phéromone cVA dans l'organisation de la vie « sociale » chez les mouches *D. melanogaster* adultes. Cependant, il pourrait cacher d'autres mécanismes. Dans la période d'immaturation et de virginité suivant l'éclosion de l'imago, les femelles vierges ne possèdent pas la phéromone cVA. Elles sont cependant attirées par les autres femelles vierges localisées sur des substrats de nourriture fraîche, et sont également attirées par des signaux, probablement olfactifs, laissés par des femelles vierges sur des substrats où elles ont séjourné durant l'heure précédente (Stamps *et al.* 2005). L'interattraction entre femelles vierges pourrait participer à l'amélioration de la qualité de l'habitat pour les larves, car la croissance et la survie des larves sur un substrat de fruit frais sont améliorées si de multiples femelles vierges ont auparavant eu accès à ce substrat (Wertheim *et al.* 2002). Il reste à découvrir quels signaux olfactifs sont impliqués dans cette interattraction entre femelles vierges. Il pourrait s'agir des phéromones sexuelles aphrodisiaques produites par les femelles vierges matures (les hydrocarbures 7,11-heptacosadiène et -nonacosadiène), mais elles sont connues pour être peu volatiles et perceptibles à faible distance (Tompkins et Hall 1981; Antony et Jallon 1982). Il a également été démontré que les mâles et les femelles vierges produisent une phéromone au niveau génital détectée par les congénères via des récepteurs différents de ceux de la cVA²⁰ (van der Goes van Naters and Carlson 2007). L'attractivité de ces phéromone(s) pourrait être analysée dans le cadre de cette interattraction entre femelles vierges.

¹⁸ Protéine de transport extracellulaire spécifique: OBP76a, aussi nommée LUSH, et récepteur neuronal olfactif spécifique: Or67d, localisé principalement sur les sensilles T1 de l'antenne des mâles et des femelles.

¹⁹ Récepteurs neuronaux olfactifs spécifiques de la cVA: Or67d et Or65a.

²⁰ Récepteurs olfactifs: Or47b et Or88a.

b) Synchronisation sociale du rythme circadien

Depuis plusieurs années, on sait que le rythme circadien est influencé par les interactions sociales chez différentes espèces animales comme les humains (Stern et McClintock 1998), les rongeurs (Mrosovsky 1988), les poissons (Kavaliers 1980) et les abeilles (Toma *et al.* 2000). Chez la drosophile, Allemand (1983) a montré que le fait de grouper des mouches conduisait à une synchronisation des rythmes individuels d'oviposition. Considérant *D. melanogaster* comme une espèce potentiellement sociale, Hendricks *et al.* (2000) ont comparés différents paramètres du rythme circadien du repos sur des mouches isolées et des mouches en groupe. Ils montrent ainsi que les mouches isolées ont, de manière similaire aux groupes de mouches, des périodes de repos qui augmentent après une période de privation. Puis Levine *et al.* (2002) montrent que dans un contexte de groupe, les mouches synchronisent leur période circadienne en communiquant probablement par signaux olfactifs. Cette adaptation du comportement individuel aux activités de ses partenaires pourrait favoriser la cohésion du groupe, comme cela a déjà été suggéré chez d'autres espèces sociales telles que les poissons vivant en banc (Kavaliers 1980) et les chauves-souris (Marimuthu *et al.* 1978, 1981).

c) Régulation des comportements conflictuels au sein du groupe

L'agrégation en groupe induit cependant des coûts se traduisant par exemple par une compétition entre les individus pour la ressource alimentaire limitée du patch, et une compétition entre les mâles pour l'accès aux femelles (pour synthèse, voir Prokopy et Roitberg 2001). Ainsi, les mâles matures sexuellement tendent à se disperser sur l'ensemble des patches alimentaires et montrent des comportements agressifs avec les autres mâles qui ont souvent été interprétés comme des comportements territoriaux (Hoffmann et Cacoyianni 1990; Ruiz-Dubreuil *et al.* 1994; Kamyshev *et al.* 2002; Chen *et al.* 2002). Les phéromones sexuelles des mâles, qui ont un effet inhibiteur de la parade sexuelle envers les autres mâles²¹, peuvent conduire à des épisodes intenses de combats entre eux en présence de femelles et de nourriture (Fig. 2; Hoffmann 1987; Chen *et al.* 2002). Les femelles peuvent également faire preuve de comportements agressifs dans les cas de compétition pour la ressource alimentaire et de rejet des mâles après qu'elles aient été fécondées, mais elles s'engagent dans des combats de plus faible intensité que les mâles (Ueda and Kidokoro 2002; Nilsen *et al.* 2004). Ces comportements agressifs forment une limite à la cohésion du groupe. Les drosophiles ont

²¹ Au niveau neuronal, l'adaptation du comportement agressif des mâles vis-à-vis des autres mâles impliquerait un traitement coordonné des stimuli par l'arborisation de la voie octopaminergique entre le ganglion suboesophagien, le lobe accessoire latéral et probablement le lobe antennaire postérieur (Certel *et al.* 2007).

cependant développé des comportements sociaux pour contrôler les interactions conflictuelles.

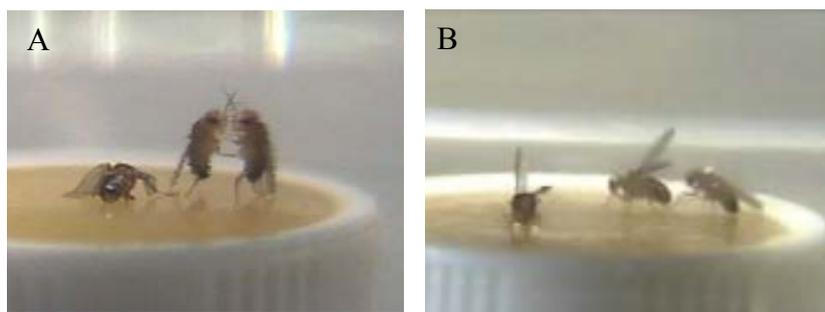


Figure 2: Exemple de comportements agressifs pouvant être observés lors d'un combat entre mâles compétiteurs en présence d'une femelle et d'une source limitée de nourriture. A. Comportement de « boxe », observé dans les combats de plus haute intensité. **B.** Comportement agressif de battement des ailes, utilisé comme moyen de défense par le perdant du combat lors de sa poursuite par le vainqueur (Source: Chen *et al.* 2002).

- Organisation hiérarchique pour les mâles

Les mâles modifient leurs comportements territoriaux après avoir passé quelque temps avec des congénères: en effet, des mâles maintenus isolés initialement agissent de manière plus agressive que des mâles maintenus en groupe initialement (Hoffmann 1990; Svetec et Ferveur 2005). Ainsi, les expériences testant l'agressivité chez la drosophile utilisent des individus qui ont été isolés plusieurs jours auparavant ou qui n'ont jamais eu de contact social durant la phase adulte (Fig. 2; Chen *et al.* 2002; Nilsen *et al.* 2007). Un gène (*Cyp6a20*) a été reconnu comme étant impliqué dans cette diminution de l'agressivité chez les mâles maintenus en groupe, probablement par régulation de la sensibilité aux phéromones (Wang *et al.* 2008). Les mâles canalisent leurs comportements territoriaux en établissant des relations hiérarchiques structurées entre eux (Chen *et al.* 2002; Yurkovic *et al.* 2006). En fonction de leur position de perdant ou de vainqueur dans les combats, ils changent leur stratégie comportementale. Les perdants apprennent à se retirer au lieu de combattre contre des adversaires familiers vainqueurs pour éviter leurs attaques, alors que les vainqueurs utilisent de plus en plus la stratégie d'attaque contre leurs adversaires ultérieurs pour prendre contrôle des ressources (Yurkovic *et al.* 2006). Lors de seconds affrontements avec des adversaires non familiers, les perdants ont une plus faible probabilité de gagner que les mouches naïves ou les vainqueurs. Dans les cas où ils gagnent, les mâles utiliseraient alors des comportements d'attaque de moyenne intensité, suggérant selon Yurkovic *et al.* (2006) des statuts intermédiaires pour ces individus. Ainsi, les drosophiles mâles pourraient acquérir différents niveaux de statut social au sein de leur groupe, en utilisant une organisation hiérarchique de

type linéaire, comme décrite par exemple chez le grillon *Gryllus campestris* (Alexander 1961).

Un mâle dominant est plus actif et moins dépendant des actions des autres mâles, ce qui pourrait favoriser sa fitness individuelle au sein du groupe. Il a d'ors et déjà été démontré que le succès territorial d'un mâle peut influencer son succès de reproduction (Dow and von Schilcher 1975). Il serait intéressant d'étudier si les femelles font une distinction entre les mâles vainqueurs et perdants, et montrent une préférence pour copuler avec les vainqueurs. Les vainqueurs pourraient par exemple avoir des comportements plus vigoureux de parade sexuelle. Le statut de perdant ou vainqueur pourrait également induire de petites variations dans la production des hydrocarbures cuticulaires, comme c'est le cas chez les blattes mâles *Nauphoeta cinerea* (Roux *et al.* 2002). Chez la drosophile, on sait notamment que des petites variations de production de 7-tricosène, principale phéromone sexuelle des mâles, peuvent être perçues par les femelles, et que la teneur en 7-tricosène augmente la probabilité d'acceptation de la copulation par les femelles (Grillet *et al.* 2006).

Ce type d'organisation hiérarchique entre mâles compétiteurs est un mécanisme bien connu de cohésion sociale chez plusieurs espèces animales, des insectes jusqu'aux mammifères (pour revue, voir Campan et Scapini 2002). Une même population peut adopter une stratégie de structure territoriale ou de structure hiérarchique en fonction des conditions écologiques rencontrées, comme le rapport entre l'espace de la ressource alimentaire et la densité de la population. Lorsque la ressource est vaste et la densité faible, les interactions agressives induisent une distanciation des individus sur l'ensemble de la ressource, générant une structure territoriale. Les mouches drosophiles vivant en promiscuité sur des ressources restreintes et éphémères pourraient établir préférentiellement une organisation sociale hiérarchique, plus adaptée pour ces conditions écologiques (Campan et Scapini 2002).

- Evitement des interactions conflictuelles

Les femelles n'établissent pas de relations hiérarchiques entre elles (Nilsen *et al.* 2004), mais comme les mâles, elles contribuent à la cohésion du groupe en adaptant leurs comportements pour éviter les interactions conflictuelles avec les autres mouches. En effet, les mouches des deux sexes ayant déjà eu une expérience sociale tendent à réduire leur agressivité dans une situation de groupe (Kamyshev *et al.* 2002; Ueda et Kidokoro 2002; Nilsen *et al.* 2004), par un double processus de facilitation sociale²² et d'apprentissage (Kamyshev *et al.* 2002). Les mouches diminuent spontanément leur activité exploratoire quand ils perçoivent la présence des autres individus sur la ressource alimentaire (Kamyshev

²² Par définition, la facilitation sociale implique « des séries comportementales ordinaires qui sont initiées ou augmentées en nombre ou en fréquence par la présence ou l'action des autres » (Wilson 1975).

et al. 2002) et augmentent certains comportements individuels comme le toilettage des pattes²³ (Connolly 1968), dont il a été établi qu'ils pouvaient représenter des mouvements signalétiques permettant aux mouches de garder un minimum de distance entre elles (Kamyshev *et al.* 2002). En effet, l'évitement des interactions conflictuelles est un comportement adaptable qui peut être conditionné à ces mouvements signalétiques (Kamyshev *et al.* 2002). Ainsi, les mouches peuvent maintenir une cohésion rapprochée du groupe sur des petits patches de nourriture en adoptant des comportements qui assurent entre chaque individu une distance minimale mais suffisante pour éviter les interactions directes.

Ce type d'organisation spatiale des individus au sein d'un groupe correspond à un comportement souvent observé chez les animaux. Nous pouvons évoquer particulièrement l'organisation collective des vols d'oiseaux et des bancs de poissons (pour revue, voir Krause et Ruxton 2002). Couzin *et al.* (2002) ont déterminé un modèle mathématique pour décrire la distribution spatiale des individus au sein d'un groupe, où ils représentent la distance minimale entre les individus comme une zone de répulsion centrée sur chaque individu, nécessaire pour maintenir un espace personnel et éviter les collisions, et une zone d'orientation, de perception et d'attraction entre les partenaires voisins. Ce modèle pourrait être appliqué à la drosophile en groupe: si une mouche voisine est présente dans cette zone de répulsion, l'individu peut répondre soit en s'écartant, soit en appliquant des petits coups de patte préventifs ou en combattant pour éloigner le voisin gênant (Kamyshev *et al.* 2002). Dans les cas où l'espace personnel est respecté, l'interattraction entre mouches permet alors de maintenir la cohésion du groupe.

4.2.5 Mémoire sociale chez la drosophile

a) Notions de mémoire sociale

En sociologie, les théories de la mémoire sociale ou collective paraissent ne pas s'adapter aux méthodes d'étude expérimentale de la mémoire des sciences cognitives, car elles s'intéressent plus à la fonction sociale de la mémoire qu'à la manière dont elle est acquise et stockée individuellement²⁴ (pour revue, voir Wilson 2005). En nous basant sur l'emploi du terme « mémoire sociale » dans diverses expériences, chez les rongeurs notamment dans le cadre de la reconnaissance d'individus familiers et apparentés (pour revue, voir Campan et

²³ Activité de « preening »: les mouches frottent leurs deux pattes antérieures l'une contre l'autre. Ce comportement, interprété comme du toilettage des soies sensorielles des pattes antérieures (Connolly 1968), pourrait également permettre aux mouches d'un même groupe de définir une distance minimum entre elles (Kamyshev *et al.* 2002).

²⁴ Voir par exemple la théorie de la mémoire sociale d'Halbwachs (1925), centrée sur la notion du lien entre la mémoire individuelle et la mémoire collective, apportant une vision de la fonction sociale de la mémoire. (Pour synthèse, voir le site: http://classiques.uqac.ca/contemporains/sabourin_paul/memoire_soc_Halbwachs/memoire_soc_Halbwachs.pdf).

Scapini 2002), et chez la drosophile dans le cadre de la mise en place d'une mémoire liée aux interactions sociales (Ganguly-Fitzgerald *et al.* 2006), nous avons établi une base de définition de la mémoire sociale telle que nous l'utilisons ici: mémoire d'un individu, acquise en milieu social, d'indices sociaux intervenants lors d'interactions avec les congénères, permettant à l'individu de reconnaître ces indices ultérieurement et d'adapter son comportement aux congénères.

Cette définition nous permet de distinguer la « mémoire sociale » de la « performance collective » mesurée en contexte social: elle correspond à une performance globale de mémoire d'un groupe d'individus, qui peut différer de la performance individuelle moyenne si les interactions entre les individus ont un effet notable sur la performance du groupe.

Les interactions entre congénères impliquent de multiples signaux sensoriels qui doivent être retenus pour que les individus les reconnaissent et adaptent de manière efficace leurs comportements face aux congénères. Il a été démontré chez de nombreuses espèces vertébrées et invertébrées, dont la drosophile (Heisenberg *et al.* 1995) et le rat (Praag *et al.* 2000), que l'expérience sociale d'un individu peut induire des modifications de son comportement social et du développement de son système nerveux, en augmentant le nombre de synapses et la taille des régions impliquées dans le traitement de l'information. Chez la drosophile, l'expérience sociale a été particulièrement étudiée sur le comportement de parade sexuelle (pour revue, voir Hirsch et Tompkins 1994; Siwicki et Ladeswki 2003; Svetec et Ferveur 2005). A présent, d'autres paradigmes comportementaux, tel que l'étude de la mémoire des relations hiérarchiques entre les mâles, pourraient connaître le même essor.

b) Mémoire des mâles de leurs relations hiérarchiques

Pour Yurkovic *et al.* (2006), les relations hiérarchiques structurées formées au cours des combats successifs suggèrent que les mouches sont capables de reconnaissance individuelle des congénères. Une reconnaissance individuelle impliquerait la reconnaissance et la mémorisation de caractères singuliers propres à chaque individu (Campan et Scapini 2002). Pour expliquer les mécanismes d'une telle reconnaissance individuelle, Yurkovic *et al.* (2006) proposent la possibilité de reconnaissance de subtiles différences d'hydrocarbures cuticulaires, que les mouches peuvent percevoir lorsqu'elles tapent la surface de leurs adversaires durant les combats, puis durant l'approche initiale et le contact préventif entre les adversaires dans les rencontres ultérieures. Cependant, une reconnaissance individuelle doit être une tâche difficile pour la drosophile, et il serait surprenant qu'un seul type de signaux soit utilisé. En effet, il a été démontré chez la drosophile que l'apprentissage combinant plusieurs modalités sensorielles comme la vision et l'olfaction, améliore les performances d'acquisition de mémoire dans une tâche en simulateur de vol (Guo et Guo 2005). Une autre

hypothèse envisageable serait qu'il n'y a pas de reconnaissance individuelle, mais une reconnaissance des adversaires familiers (déjà rencontrés) sans identification de leurs traits individuels, accompagnée d'une distinction des statuts hiérarchiques pouvant être basée sur des différences de concentrations en hydrocarbures cuticulaires²⁵ et des différences de comportement de l'adversaire.

Avec leur protocole actuel, Yurkovic *et al.* (2006) ont montré que les mouches retiennent ces informations sociales pour au moins 30 min, et il semble prévu qu'ils testent un autre protocole adapté pour vérifier la mémoire à plus long terme. Chez d'autres espèces où le statut social est mémorisé à plus long terme (poisson *Lepomis gibbosus*: Chase *et al.* 1994; poisson *Rivulus marmoratus*: Hsu et Wolf 1999; araignée *Argyrodus antipodiana* : Whitehouse 1997), le vainqueur d'un combat aura plus de chances de gagner ses combats ultérieurs et inversement pour un perdant, qui se souviendra de son statut sur des périodes plus importantes encore qu'un vainqueur. Cet effet peut être important pour la survie à long terme de l'individu, car les perdants s'engagent ensuite avec plus de précaution dans un futur combat (Yurkovic *et al.* 2006). La durée de cette mémoire reste très variable selon les espèces, et dépend de l'environnement social et du nombre d'interactions au sein d'un groupe.

c) Sélection sexuelle chez les femelles: implication d'une mémoire sociale ?

L'accouplement sélectif offre un autre cas de distinction d'individus familiers ou de catégorisation de congénères chez la drosophile, et qui a été exploré depuis longtemps (pour revue, voir Singh et Sisodia 2000). Il a été montré depuis les années 1960 chez plusieurs espèces de drosophile que le succès reproducteur des mâles, observé par la transmission de leurs génotypes à la descendance, est souvent dépendant de la fréquence de leur génotype au sein de la population. Un avantage des mâles rares apparaît lorsque deux types de mâles sont présents en proportions inégales. On observe alors un nombre plus important de femelles inséminées par les mâles minoritaires. Ainsi, un mâle visiteur d'une autre population arrivant occasionnellement dans un groupe pourrait être favorisé par les femelles. Ce phénomène pourrait avoir une importante signification évolutive, en participant au maintien de hauts niveaux de polymorphisme génétique pour une même espèce. Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de cette discrimination. Le principal mécanisme proposé est que les femelles ont la capacité de discriminer et de rejeter les mâles qui les avaient courtisées en premier durant leur période de non-réceptivité sexuelle, notamment par un processus d'habituation proposé par Ehrman et Spiess en 1969 (Pour revue, voir Singh et Sisodia 2000). Vu la probabilité plus élevée que ces mâles soient du type le plus commun du groupe, les

²⁵ Voir dans l'introduction, partie 4.2.4.c « Régulation des comportements conflictuels au sein du groupe », l'hypothèse proposée dans le paragraphe « Organisation hiérarchique chez les mâles ».

mâles plus rares auraient plus de chance de ne pas être rejetés par les femelles lorsque celles-ci deviennent réceptives sexuellement, par le fait qu'ils passeraient à travers la barrière de cette habitude. L'accouplement sélectif serait donc dépendant de l'expérience des femelles. Plusieurs chercheurs ont mis en évidence cet accouplement sélectif pour des mâles proches génétiquement mais provenant de cultures d'élevages différents (en faisant varier notamment les températures d'élevage; pour revue, voir Singh et Sisodia 2000). Il n'y aurait donc pas une « simple » dépendance génétique. Les femelles pourraient reconnaître de subtiles différences d'odeur ou de comportements lors de la parade sexuelle des mâles, et qui diffèreraient en fonction du génotype et/ou du milieu socio-environnemental de l'élevage.

Ces différences pourraient avoir une origine sociale. Kim et Ehrman (1998) et Maynard Smith (1956) travaillant sur *Drosophila paulistorum* et *Drosophila subobscura* ont observé que des mâles socialement isolés durant leur développement produisaient une parade sexuelle plus intense et avaient plus de succès reproducteur que les mâles élevés en groupe. Higgins *et al.* (2005) ont mis en évidence un phénotype comportemental de groupe. Ils ont trouvé que des groupes de drosophiles génétiquement identiques développaient leur propre schéma d'activité en liaison avec leur composition sociale. Il serait intéressant de vérifier si ces groupes isogéniques ont par exemple des différences de synchronisation du rythme d'activité et de hiérarchie entre les mâles. Des travaux plus anciens de Ehrman en 1969 et de Hay en 1972 ont également proposé que les femelles reconnaissaient les mâles familiers par des signaux olfactifs, et suggéré une signature olfactive du groupe (voir Hay 1972), proche de celle décrite pour les insectes vivant en colonies tels que les fourmis et les abeilles (Jaisson 1985; voir pour synthèse Howard et Blomquist 2005).

d) Influence de l'expérience sociale sur le sommeil

Depuis déjà quelques années, des études réalisées essentiellement chez les mammifères comme les humains, le chat, le rat et la souris montrent que l'expérience d'un individu induit des modifications de son sommeil, et que les causes seraient la consolidation de la mémoire des événements liés à cette expérience (Ribeiro *et al.* 1999; Maquet *et al.* 2000; Miyamoto *et al.* 2003). Depuis 2006, la drosophile est devenue également un modèle d'étude du rôle du sommeil dans la consolidation de la mémoire sociale (Ganguly-Fitzgerald *et al.* 2006). L'expérience sociale augmente de manière significative le temps de sommeil dans la période de jour chez la drosophile. Ce phénomène reflète un processus de plasticité dépendant de l'expérience sociale la plus récente. Ganguly-Fitzgerald *et al.* ont mis en évidence plusieurs corrélations entre le besoin en sommeil et la modulation de la mémoire, tels que l'activation des voies nerveuses dopaminergiques dans le cerveau et la suppression du phénomène d'augmentation du besoin en sommeil dépendant de l'expérience en cas de mutation de gènes

de mémoire à court-terme et à long terme. Les auteurs ne vont pas jusqu'à décrire quelles interactions sociales sont impliquées mais montrent que celles-ci ne sont pas dépendantes du sexe et qu'elles utilisent principalement les signaux visuels et olfactifs. Ils montrent également que le besoin en sommeil, et par corrélation l'expérience sociale, est proportionnel au nombre d'individus dans le groupe. Ainsi, l'augmentation du besoin en sommeil pourrait être due soit à de la fatigue engendrée par les interactions sociales (comme par exemple les combats entre mâles, le contrôle des comportements agressifs, la parade sexuelle et l'accouplement...) soit à de l'apprentissage lié à ces interactions sociales (comme par exemple l'apprentissage de l'inhibition de la parade sexuelle et l'apprentissage des relations hiérarchiques chez les mâles). Ganguly-Fitzgerald *et al.* observent une augmentation du besoin en sommeil chez des mouches mâles préalablement soumis au conditionnement de l'inhibition de la parade sexuelle, mais ils montrent que le sommeil n'est pas indispensable à la consolidation de la mémoire à long terme, vu que les mâles privés du sommeil développent tout de même une rétention à long terme de la mémoire liée à l'inhibition de la parade.

Il serait intéressant d'analyser ce phénomène de besoin en sommeil dépendant de l'expérience dans le cas de la mémoire des relations hiérarchiques chez les mâles, et de la reconnaissance de caractéristiques des mâles chez les femelles.

4.2.6 Avantages de la vie sociale chez la drosophile

a) Avantages au stade adulte

- Avantage reproductif

Pour les mouches adultes, le fait de s'agréger sur les patches alimentaires a été essentiellement décrit comme un comportement facilitant la recherche des partenaires sexuels pour la reproduction (Robinson et Ben Shahr 2002). Il semble cependant ne pas être le seul avantage à la vie en groupe des drosophiles.

- Coopération dans la recherche alimentaire

La promiscuité des congénères sur un patch pourrait favoriser leur utilisation de la ressource alimentaire (Lefranc 2001; Kamyshev *et al.* 2002), phénomène déjà connu chez d'autres insectes territoriaux, considérés solitaires (pour revues, voir Prokopy et Roitberg 2001; Wertheim *et al.* 2005). Cette hypothèse n'a pour l'instant jamais été validée chez la drosophile adulte. Il a été découvert cependant de la coopération²⁶ dans la recherche

²⁶ Coopération: toutes interactions sociales qui induisent un net bénéfice pour le groupe malgré les possibles coûts individuels (Costa 2006).

alimentaire au sein de groupes de drosophiles adultes (Tinette *et al.* 2004). Lorsqu'un patch alimentaire est épuisé, les mouches n'explorent pas de manière individuelle tous les autres patches disponibles, ce qui aurait un coût évolutif trop élevé par rapport à une exploration « en groupe ». La recherche d'un nouveau site alimentaire se fait en deux phases: tout d'abord, une première partie des mouches (les exploratrices) partent explorer l'environnement et visitent de manière aléatoire les différents patches disponibles, et enfin s'arrêtent sur le patch le plus favorable. Puis le reste du groupe (les suiveuses) les rejoint sur ce patch où le groupe se réagrège. Du point de vue génétique, on sait déjà que le gène *dunce* joue un rôle essentiel dans cette forme de comportement coopératif, car les mouches mutantes *dunce* sont déficientes pour ce comportement de recherche/agrégation (Tinette *et al.* 2004). De manière intéressante, ce même gène pourrait être directement impliqué dans la division du travail chez des abeilles eusociales²⁷, ce qui laisse penser que le gène *dunce* pourrait avoir un rôle central dans les comportements coopératifs, conservé au cours de l'évolution (Judice *et al.* 2006). Lors de l'exploration en vol, les mouches doivent intégrer un ensemble de signaux olfactifs, visuels et acoustiques pour guider la direction de leur vol et décider de s'arrêter ou non sur un patch. Les mécanismes neurologiques à la base de cette exploration sont en cours d'exploration (Tinette *et al.* 2007).

- Stratégie d'évitement de prédateur en groupe ?

Un autre avantage de la promiscuité des congénères, même dans le cas d'une espèce solitaire, peut intervenir en cas de prédation. En effet, les individus ont un risque d'attaque dilué lorsqu'ils sont au sein d'une population de forte densité (Watt *et al.* 1997; Parrish et Edelstein-Keshet 1999; Stephens *et al.* 1999; Hunter 2000), et l'attaque par un prédateur peut induire un dispersement des individus. Dans la nature, la drosophile adulte semble avoir peu de prédateurs naturels, et à ma connaissance, il n'a jamais été mis en évidence de comportements sociaux relatifs à une stratégie de défense en groupe contre les prédateurs. Cependant, il a été démontré que des mouches stressées produisent un surplus de CO₂ respiratoire que les congénères perçoivent et auquel ils répondent en fuyant les mouches productrices (Suh *et al.* 2004; Jones *et al.* 2007). Les auteurs indiquent que le rôle éthologique et écologique du CO₂ chez la drosophile reste à explorer, mais qu'il promet d'être important vu la haute spécificité du circuit nerveux impliqué dans sa détection²⁸. Il serait donc

²⁷ Chez l'abeille sociale *Melipona quadrifasciata*, il a été découvert un niveau d'expression de *dunce* plus élevé chez les ouvrières que chez la reine, suggérant un programme moléculaire impliquant le gène *dunce* pour la différenciation en castes des abeilles émergentes (Judice *et al.* 2006).

²⁸ Activation spécifique des récepteurs Gr 21a et Gr 63a localisés sur les sensilles basiconiques ab1, et activation unique et spécifique du glomerule V au niveau du lobe antennaire (Suh *et al.* 2004; Jones *et al.* 2007).

intéressant de rechercher si le signal CO₂ peut être utilisé comme signal d'alarme au sein d'un groupe de drosophiles.

- Augmenter collectivement les chances de survie de la progéniture

Les drosophiles n'ont pas à consacrer une grande partie de leur ressource énergétique à la croissance de leur progéniture, en comparaison avec les espèces de stratégie reproductrice semelpare, où les femelles ne pondent leurs œufs qu'une seule fois dans leur vie, souvent dans un même nid, et meurent rapidement ensuite (Costa 2006). Cependant, plusieurs études ont mis en évidence le caractère adaptatif de l'agrégativité chez les drosophiles adultes pour favoriser la survie de la progéniture.

La recherche coopérative du site alimentaire répond tout d'abord à la motivation de trouver la ressource la plus favorable pour l'alimentation, mais également pour la ponte. De plus, les drosophiles en groupe améliorent la qualité de l'habitat pour leurs progénitures (pour revue, voir Wertheim *et al.* 2005). En effet, il a été démontré chez *D. melanogaster* que les mouches inoculent des levures et autres micro-organismes sur les fruits frais, qui accélèrent le processus de décomposition du milieu et assurent à leur progéniture une source de nourriture de bonne qualité, les levures étant une source de nourriture importante pour les larves (Wertheim *et al.* 2002). De plus, la présence préalable de nombreux adultes sur le substrat est associée à une diminution du développement des moisissures, présentant un effet délétère sur le développement des larves (Hodge *et al.* 1999). Cette diminution pourrait provenir de l'inoculation d'un antifongique, par l'action des levures ou par leur propre action de piétinement du milieu (Wertheim *et al.* 2002).

L'agrégation des femelles sur un même patch et l'agrégation de la ponte induit un développement en collectivité des larves (pour revue, voir Wertheim *et al.* 2005). Il a été démontré chez *D. subobscura* l'existence d'un effet Allee, c'est à dire une relation en cloche, entre la densité d'œufs déposés et la probabilité de survie des larves, avec un maximum de survie pour des densités intermédiaires (Rohlf et Hoffmeister 2003). En effet, une trop forte densité de larves sur un petit site engendre de la compétition pour la ressource alimentaire qui affecte la survie des larves, et une trop faible densité de larves réduit la fitness individuelle (Rohlf et Hoffmeister 2003, 2004; Rohlf 2005)²⁹.

Les mouches ont également développé un processus comportemental pour adapter la quantité de ponte au nombre et à la taille des ressources. La quantité d'œufs pondus par

²⁹ L'étude de Wertheim *et al.* (2002) n'avait pas permis de retrouver cet effet Allee entre densité et survie larvaire chez *D. melanogaster*. Cependant, une étude plus ancienne sur *D. subobscura* n'avait pas non plus donné de résultats (Hoffmeister et Rohlf 2001). Les auteurs ont suggéré l'importance de la qualité du substrat, qui doit être bienensemencé en micro-organismes pour assurer le développement de plusieurs nids et limiter la compétition larvaire, afin d'obtenir des interactions sociales positives entre les larves de drosophile.

femelle diminue avec l'augmentation du nombre de femelles (Wertheim *et al.* 2006), et les femelles adaptent la taille des nids à la surface de ressource disponible (Godfray *et al.* 1991; Heard et Remer 1997). Ainsi, un bénéfice important de l'agrégativité chez les drosophiles adultes est l'amélioration de la survie et du développement de la progéniture, évoquant des comportements de soins maternels promulgués avant la naissance de la progéniture connus chez les insectes de stratégie reproductrice semelpare (pour revue, voir Costa 2006). Les femelles peuvent être sélectionnées génétiquement pour leur comportement d'agrégativité de ponte, ce qui montre que le niveau d'agrégation est au moins en partie sous contrôle génétique (Ruy-Dubruel *et al.* 1994). La relation en cloche entre densité des œufs et fitness larvaire pourra également délimiter la production des mouches adultes et donc le nombre de femelles fécondables si les adultes restent agrégés dans leur groupe initial.

b) Avantages aux stades larvaires

De nombreux cas de « sociétés larvaires », c'est-à-dire de vie en groupe aux stades larvaires, existent chez les espèces d'insectes holométaboles, et ils peuvent prendre des formes très variées en fonction des espèces (pour revue, voir Costa 2006). Certaines construisent des abris ou des microenvironnements locaux adaptés à leur développement, alors que d'autres se déplacent en troupe à travers la canopée, selon un mode processionnaire ou de manière plus détachée. La plupart utilise juste des marqueurs chimiques pour rester en contact et d'autres ont perfectionné l'art de la communication pour le recrutement. La cohésion du groupe peut influencer leur façon de s'alimenter et leur système de défense de manière variable, et le degré de socialité larvaire varie en conséquence. Toutes les espèces pondant leurs œufs en nids ne produisent pas forcément une société larvaire durable. Chez le Bombyx disparâtre *Lymantria dispar* (L.) et l'Arpenteuse d'automne *Alsophila pometaria* (Harris), les larves se dispersent très tôt après l'éclosion des œufs.

Chez la drosophile, si effectivement le regroupement des larves à l'éclosion est dû aux comportements maternels d'agrégation des pontes, les larves restent agrégées par de l'attraction mutuelle entre les membres du groupe, dont les mécanismes restent à trouver, et par de l'attraction commune pour les mêmes signaux de l'environnement (Rohlf 2005). Il a été démontré que le développement en groupe chez les larves leur apporte différents bénéfices tout au long de la vie larvaire, dont nous avons répertorié les principaux ci-dessous.

- Facilitation alimentaire

Plusieurs études chez différentes espèces de drosophiles (*D. melanogaster*, *D. subobscura* et *D. hydei*) suggèrent qu'une facilitation sociale dans l'exploitation alimentaire de la

ressource pourrait participer à une meilleure survie des larves en groupe (Gregg *et al.* 1990; Courtney *et al.* 1990; Hoffmeister et Rohlf 2001; Rohlf et Hoffmeister 2004; Wertheim *et al.* 2005). Chez ces espèces, il a été démontré que les larves peuvent se développer collectivement à partir de substrats insolites comme des carcasses d'insectes (chitine, amylose et cellulose) sans l'aide de microorganismes (Gregg *et al.* 1990). Cette forme de digestion collective a été plus finement décrite chez l'espèce *D. hydei*, où les larves régurgitent les enzymes sur le substrat, conduisant à une digestion externe collective du substrat, puis consomment le produit prédigéré (Gregg *et al.* 1990). L'existence de ce type de coopération dans la digestion externe a également été suggérée chez des araignées sociales (Krafft 1971).

- Facilitation de la défense contre les prédateurs et comportement de coopération anti-compétiteur

Les comportements conduisant à une agrégation spatiale de congénères compétiteurs ont également souvent été interprétés comme une stratégie d'évitement des prédateurs (Krebs et Davies 1996). Chez la drosophile, les principaux prédateurs naturels des larves sont des guêpes parasitoïdes, notamment des genres *Asobara* et *Leptopilina* (Carton *et al.* 1986; Rohlf et Hoffmeister 2004). Il a été démontré chez *D. subobscura* que le risque d'attaque par ces parasitoïdes est réduit chez les larves agrégées, probablement par la création de refuges locaux sur le substrat où le parasite ne peut pas atteindre les larves et dont la construction serait facilitée par les larves mangeant en groupe (Rohlf et Hoffmeister 2004).

L'interattraction entre les larves est également utilisée dans un comportement de coopération anti-compétiteur contre les moisissures se développant sur leur substrat (Rohlf 2005). Le développement de ces champignons filamenteux, importante cause de mortalité chez les petits groupes de larves, est perturbé et supprimé par la locomotion et l'alimentation des larves en nombre suffisant (Hodge et Arthur 1997; Wertheim *et al.* 2002; Rohlf 2005; Rohlf *et al.* 2005). Ce comportement collectif est plus complexe qu'une simple facilitation sociale, car les larves ne tombent pas sur le champignon par hasard durant l'exploration du substrat mais coopèrent pour contrôler rapidement le développement du champignon. Ainsi, les larves *D. melanogaster* choisissent majoritairement de s'agréger sur les patchs infectés par de jeunes colonies de moisissure *Aspergillus niger* lorsqu'elles ont le choix avec des patchs non infectés (Rohlf 2005). Cette agrégation sur les patchs infectés serait également un moyen d'évitement du parasitoïde *Asobara tabida*, qui a tendance à éviter les patchs infectés (Rohlf 2008). De plus, les larves de drosophile parasitées survivent mieux face à la moisissure si elles sont en groupe (Rohlf 2008).

- Coopération dans le comportement de forage pour la pupaison

Les larves montrent également des comportements coopératifs au dernier stade larvaire. Wu *et al.* (2003) ont décrit un comportement de participation collective et locale à un travail de forage du milieu alimentaire, correspondant à une phase de fuite du milieu nourricier et de recherche d'un endroit sec, adapté à leur pupaison. Les larves se déplacent vers la périphérie de la ressource (« bordering »), s'attirent et s'agrègent en un ou plusieurs sites (« clumping ») et adoptent un comportement de forage (balancement vertical du corps d'arrière en avant) qui permet de découper et de soulever des morceaux de nourriture, laissant place à une zone exempte de nourriture. Les larves isolées n'adoptent pas ce comportement de forage, induit par les interactions sociales entre les larves agrégées, d'autant plus rapidement qu'il y a de larves (Wu *et al.* 2003). La baisse d'expression du neuropeptide F de la drosophile, homologue du neuropeptide Y (NPY-like) chez l'homme, coordonne les changements comportementaux liés à l'apparition de l'aversion alimentaire (modulée via des neurones sensitifs particuliers comportant le récepteur au fructose painless; Xu *et al.* 2008) et à la coopération pour le forage (Wu *et al.* 2003). L'implication de ce neuropeptide est d'autant plus intéressante que des similarités de fonction existent chez le vers *Caenorhabditis elegans* pour le « clumping » et le « bordering » pendant l'alimentation (de Bono et Bargmann 1998), potentiellement chez l'abeille *Apis mellifera* pour les changements de fonction en butineuses (Ben-Shahar *et al.* 2002), et chez la souris pour la régulation des comportements agressifs liés à la nourriture (Emeson et Morabito 2005). Ainsi le système NPY pourrait avoir été conservé dans l'évolution pour la régulation des comportements sociaux liés à la recherche alimentaire.

4.2.7 Conclusion sur la socialité chez la drosophile

Nous avons répertorié ici un certain nombre de comportements sociaux et d'avantages à la vie en groupe chez la drosophile apparaissant aux différents stades de développement, tels que l'inter-attraction, la coopération, la facilitation alimentaire et la défense contre les prédateurs et compétiteurs, et l'organisation du groupe à l'âge adulte comme système reproductif visant à favoriser la survie de la progéniture (voir Tableau 1 pour synthèse).

De manière similaire, le travail de synthèse de Costa (2006) a permis de mettre en valeur le caractère social d'un certain nombre d'insectes non-eusociaux, et si on se réfère à son travail, il ne semble pas prématuré de parler de socialité au niveau larvaire pour la drosophile. Pour le stade adulte, cela dépend de la définition qu'on donne à la socialité. Si on se réfère à celle de Chauvin (1963; voir Campan et Scapini 2002), la vie en groupe des drosophiles adultes peut être caractérisée de sociale.

	Comportements sociaux observés	Mécanismes mis en évidence	Références
Stade adulte	Agrégation et maintien de l'agrégation entre différents patches alimentaires	- interattraction - implication de l'olfaction (phéromone d'agrégation cVA + phéromones sexuelles)	Lefranc <i>et al.</i> 2001 Tinette <i>et al.</i> 2004 Wertheim <i>et al.</i> 2006 Takahashi 2006
	Coopération pour la recherche alimentaire	- existence de mouches exploratrices et de mouches suiveuses - implication du gène <i>dunce</i>	Tinette <i>et al.</i> 2004
	Synchronisation du rythme circadien	implication probable de l'olfaction	Levine <i>et al.</i> 2002
	Limitation de l'agressivité en groupe	- diminution de l'activité exploratoire - augmentation de l'activité de "preening" pour le maintien d'une distance minimum entre les individus, et petits coups de pattes préventifs - implication de l'olfaction: régulation de la sensibilité aux phéromones (gène <i>Cyp6a20</i>)	Hoffmann 1990 Kamyshev <i>et al.</i> 2002 Ueda et Kidokoro 2002 Nilsen <i>et al.</i> 2004 Svetec et Ferveur 2005 Wang <i>et al.</i> 2008
	Organisation hiérarchique des mâles	implication probable de l'olfaction	Chen <i>et al.</i> 2002 Yurkovic <i>et al.</i> 2006
	Mémoire sociale	- reconnaissance de familiers (+ reconnaissance individuelle ?) - implication probable de l'olfaction - modification de phases de sommeil pour la modulation de la mémoire sociale	Ehrman et Spiess 1969 Hay 1972 Yurkovic <i>et al.</i> 2006 Ganguly-Fitzgerald <i>et al.</i> 2006
	Amélioration en groupe de l'habitat pour la progéniture	- inoculation de levures - inhibition du développement des moisissures	Wertheim <i>et al.</i> 2002
	Adaptation de la quantité de ponte à la surface de ressource disponible (pour un effet Allee dans le développement de la progéniture)	au moins en partie sous contrôle génétique	Godfray <i>et al.</i> 1991 Heard et Remer 1997 Ruy-Dubruel <i>et al.</i> 1994 Wertheim <i>et al.</i> 2006
stades larvaires	Maintien de l'agrégation entre les larves	interattraction	Rohlfs 2005
	Facilitation sociale de l'exploitation de ressources alimentaires	existence probable de processus de digestion collective, comme pour l'espèce <i>Drosophila Hydei</i>	Gregg <i>et al.</i> 1990
	Facilitation sociale de la défense contre des prédateurs	- création probable de refuges dans le substrat sous l'effet de l'alimentation en groupe - agrégation sur les patches légèrement infectés par les moisissures, qui sont évités par les parasitoïdes comme <i>Asobara tabida</i>	Rohlfs et Hoffmeister 2004 Rohlfs 2008
	Coopération anti-compétiteur (moisissures)	interattraction et agrégation sur les patches légèrement infectés par les moisissures, pour diminuer leur développement	Hodge et Arthur 1997 Wertheim <i>et al.</i> 2002 Rohlfs 2005 Rohlfs <i>et al.</i> 2005
	Facilitation sociale de la résistance aux effets délétères du parasitisme par <i>Asobara tabida</i> en situation de compétition		Rohlfs 2008
	Coopération dans un comportement de forage pour le passage à la pupaison, au dernier stade larvaire	- apparition de l'aversion alimentaire (implication de neurones sensitifs au récepteur <i>Painless</i>) - interattraction et agrégation - induction sociale du comportement de forage - implication du neuropeptide Y-like	Wu <i>et al.</i> 2003 Xu <i>et al.</i> 2008

Tableau 1: Synthèse des comportements sociaux et des phénomènes de facilitation sociale et de coopération découverts jusqu'à présent chez *Drosophila melanogaster*.

Leur agrégation n'est en effet pas liée uniquement au rapprochement des reproducteurs et la cohésion du groupe existe sur de plus longue durée, avec le maintien du groupe durant la dispersion sur les nouveaux patchs alimentaires. Nous suggérons ici une cohésion du groupe chez la drosophile qui s'exprimerait dans des conditions environnementales particulières, et qui serait basée sur les mécanismes de l'inter-attraction, de la communication sociale, du contrôle des interactions agressives (avec notamment l'établissement d'une hiérarchie entre les compétiteurs mâles), de la synchronisation des activités individuelles au sein du groupe, et de la capacité de mémoire sociale pour la reconnaissance des congénères familiers et peut-être même pour une reconnaissance individuelle des congénères.

V. DESCRIPTION GENERALE DU SYSTEME NERVEUX DE LA DROSOPHILE

Le système nerveux de la drosophile adulte est composé d'environ deux cent mille neurones, organisés en structures fonctionnelles. Le système nerveux périphérique de la drosophile possède différentes voies spécifiques à l'olfaction, la vision, la gustation et l'audition, qui projettent sur des structures spécifiques du système nerveux central. Le système nerveux central est divisé en deux grandes parties: la chaîne nerveuse ventrale, comprenant les ganglions thoracique et abdominale, et le cerveau (Fig. 3).

Le cerveau est composé de 95000 à 110000 cellules (Takashi *et al.* 2005). Comme chez les autres insectes, les neurones sont unipolaires, avec les corps cellulaires massés à la périphérie du cerveau et les projections dendritiques et axonales regroupées dans la masse importante du neuropile.

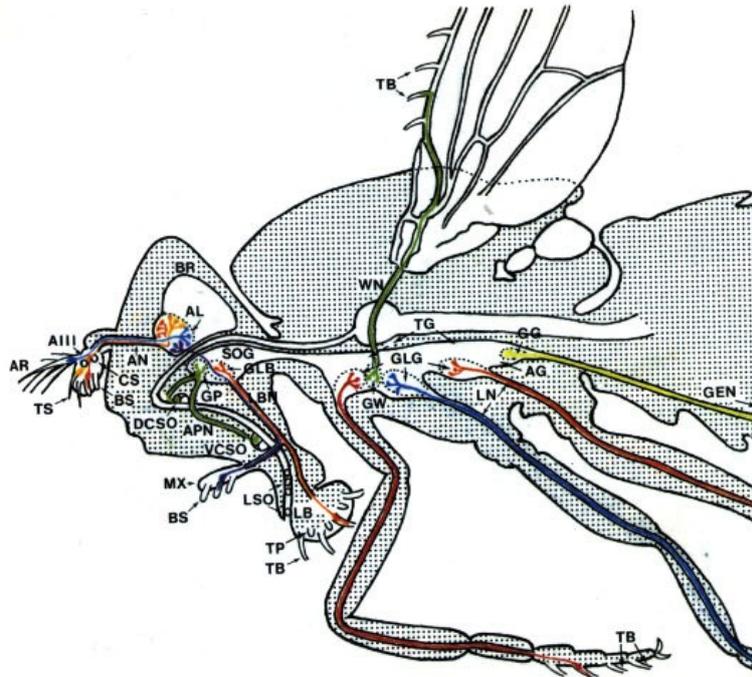


Figure 3: Organisation du système chimiosensoriel chez *Drosophila melanogaster*. AIII: troisième segment antennaire (funicule); AR: arista; MX: palpes maxillaires; GEN: genitalia; LB: labellum (palpes labiaux); BS: sensille basiconique; TS: sensille trichoïde; TP: soie courte gustative; TB: soie du goût; CS: sensille coelonique; LSO: organe sensitif du labre; DCSO: organe sensitif dorsal cibarial; VCSO: organe sensitif ventral cibarial; AN: nerf antennaire; APN: nerf pharyngien; LBN: nerf labial; LN: nerfs des pattes; WN: nerf des ailes; AL: lobe antennaire; BR: ganglion supra-oesophagien; TG: ganglion thoracique; AG: ganglion abdominal; GG: centre gustatif du genitalia; GLB: centre gustatif du labellum; GLG: centres gustatifs des pattes; GP: centre gustatif du pharynx; GW: centre gustatif de l'aile (Source: Stocker 1994).

Le cerveau, composé de différents ganglions, est traversé par le tube digestif de manière antérograde. On distingue ainsi les ganglions supra- et sub-oesophagiens.

Le **ganglion sub-oesophagien** (SOG) est le principal centre de traitement de la gustation. Au niveau du système nerveux périphérique, il existe des récepteurs gustatifs sur les tarsi des pattes, sur les ailes, sur le *genitalia*, sur le labellum du proboscis et dans le pharynx. Les nerfs provenant des pattes, des ailes et du *genitalia* rejoignent d'abord la chaîne nerveuse ventrale au niveau du ganglion thoracique ou du ganglion abdominal avant de rejoindre le SOG (Stocker et Schorderet 1981; Stocker 1994; Singh 1997), alors que ceux provenant des parties buccales rejoignent directement le SOG. L'information gustative est codée de manière assez basique, avec une spécificité réduite des récepteurs et des sensilles gustatifs et l'absence d'organisation glomérulaire au niveau du SOG. Ce système nerveux permet à la mouche de détecter essentiellement la nature sucrée ou amère d'un aliment et sa concentration (ce qui lui permet d'éviter l'ingestion de produit potentiellement toxique), mais pas vraiment de

différencier le goût de différents sucres (Hiroi *et al.* 2002; Thorne *et al.* 2004; Wang *et al.* 2004b), à part pour le sucre tréhalose qui est perçu via des récepteurs spécifiques (Dahanukar *et al.* 2001).

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

Le **deutocerebrum** est composé principalement des lobes antennaires, centre de traitement de l'olfaction. L'olfaction est assurée par deux organes principaux: les antennes et les palpes maxillaires. Les neurones olfactifs projettent *via* les nerfs antennaires ou le nerf labial sur les glomérules des lobes antennaires. Les informations olfactives sont codées et catégorisées de manière précise par l'activation de récepteurs et de sensilles olfactifs spécifiques, se projetant vers les lobes antennaires au niveau de glomérules spécifiques. Les neurones efférents des lobes antennaires projettent vers le protocerebrum, au niveau des corps pédonculés et de la corne latérale (Ito *et al.* 1998) (voir fig. 4). Les corps pédonculés assureraient l'intégration des stimuli olfactifs avec d'autres modalités sensorielles (mémoire olfactive) et la corne latérale assurerait le comportement d'évitement des odeurs aversives (Ito *et al.* 1998; Wang *et al.* 2003).

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

NB: les antennes sont également l'organe de réception de l'audition : le troisième segment antennaire (le funicule) et la soie qui le prolonge (l'arista) constitue l'organe récepteur des sons, et le second segment renferme l'organe de Johnston, le centre de traitement de ces informations auditives (pour revue, voir Eberl 1999; Göpfert et Robert 2002).

Le **protocerebrum**, le plus important par sa taille et sa complexité, regroupe quatre grandes structures : les deux corps pédonculés, le complexe central, les deux lobes optiques et la pars intercerabralis.

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

- les **corps pédonculés** (CP; Fig. 4) sont des structures en forme de champignon, situées de part et d'autre de l'axe de symétrie du cerveau et séparées du reste du neuropile par une fine couche de cellules gliales.

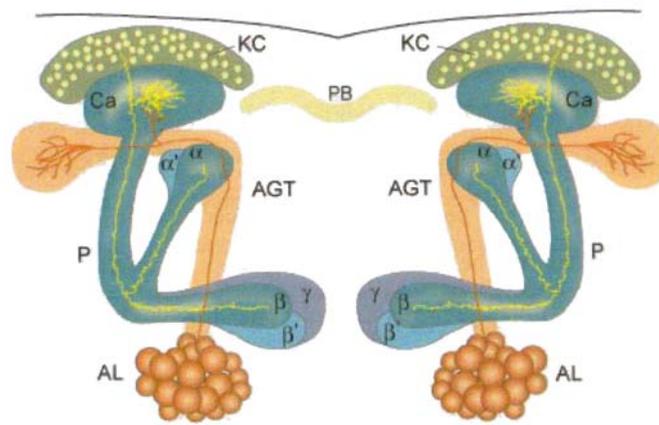


Figure 4: Schéma des corps pédonculés et des tractus antenno-glomérulaires de la drosophile. Le signal olfactif est traité au niveau des glomérules des lobes antennaires (AL). Parmi les voies de sortie des lobes antennaires, on trouve le tractus antenno-glomérulaire (AGT), projetant en arrière à travers les calices (Ca) des corps pédonculés et de manière latérale au niveau du protocerebrum latéral (corne latérale). Les corps cellulaires des cellules de Kenyon (KC) ont leurs dendrites au niveau des calices et projettent à travers eux leurs axones de manière rostrale dans le pédoncule (P). Le pédoncule donne naissance aux lobes verticaux α et α' et aux trois lobes horizontaux β , β' et γ . PB : pont protocérébral (Source: Didelot 2006).

Chaque CP est composé d'environ 2500 neurones dits intrinsèques, appelés cellules de Kenyon, et de neurones dits extrinsèques, afférents ou efférents des cellules de Kenyon (Ito *et al.* 1998). Les corps cellulaires des cellules de Kenyon, situés dans la partie dorsale postérieure de chaque hémisphère, projettent leurs dendrites dans les calices, structures volumineuses et arrondies situées en dessous des corps cellulaires. Ces dendrites reçoivent des afférences olfactives provenant des lobes antennaires par le tractus antenno-glomérulaire, et peut-être des afférences d'autres modalités sensorielles (Stocker *et al.* 1990). Les axones des cellules de Kenyon se projettent de manière fasciculée, en contournant le calice, et convergent en dessous pour former le pédoncule. Dans la partie antérieure du cerveau, les axones du pédoncule se divisent en différents lobes: trois lobes médiaux (β , β' et γ), deux lobes dorsaux (α et α'), et une petite structure latérale appelée le talon (Crittenden *et al.* 1998). Les cellules de Kenyon projettent soit un axone bifurquant vers les lobes α et β , soit un axone bifurquant vers les lobes α' et β' , soit un axone sans bifurcation vers le lobe γ ou le talon. Les lobes reçoivent de nombreux neurones afférents provenant du neuropile, pouvant répondre à plusieurs modalités sensorielles (pour revue, voir Ito *et al.* 1998). Les lobes projettent également des neurones efférents entre eux et vers d'autres centres de traitement du protocerebrum antérieur (supérieur médian et latéral, et inférieur médian), de manière plus ou moins spécifique en fonction des lobes (Ito *et al.* 1998). Les neurones efférents des corps

pédonculés ne renverraient pas les informations directement vers les zones motrices, mais pourraient soit les connecter via plusieurs interneurons intermédiaires soit via les autres centres de traitement du protocebrum antérieur (Ito *et al.* 1998). Les CP sont connus pour être impliqués dans le traitement supérieur des signaux olfactifs, dans les mécanismes d'apprentissage et de mémoire pour différents paradigmes de conditionnement (conditionnements olfactifs: pour revue, voir Wolf *et al.* 1998; Waddell et Quinn 2001; parade sexuelle: McBride *et al.* 1999), dans la phase initiale de comportements adaptatifs complexe de choix (Tang et Guo 2001; Zhang *et al.* 2007), et dans la régulation du sommeil (Joiner *et al.* 2006; Pitman *et al.* 2006).

- le **complexe central** est localisé dans la partie centrale du cerveau. Il est composé du pont protocérébral (Fig. 4), du corps en éventail, de deux nodules et du corps en ellipse. Il reçoit essentiellement des informations sur l'activité locomotrice, provenant de la totalité du cerveau.

- la ***pars intercerebralis***, située dans la partie antérieure du cerveau, est composée de neurones sécréteurs, qui envoient des projections vers le ganglion tritocérébral (Strausfeld *et al.* 1998) et vers la partie ventrale et le thorax, notamment au niveau des *corpora cardiaca* et *allata*, organe neuro-endocrine du thorax (équivalent au système hypothalamo-hypophysaire chez les vertébrés) impliqué dans diverses fonctions comme la mue (Strausfeld 1976).

Enfin le **tritocérébron** se compose de deux lobes relativement petits et bilatéraux à la base du cerveau. Ceux-ci jouxtent le ganglion sub-oesophagien. Les deux lobes sont reliés par un faisceau de fibres nerveuses appelées une "commissure". La composition du tritocerebrum est encore mal définie, mais ils passent pour établir des relations sensorimotrices avec la bouche et à la région digestive (nerfs stomatogastriques). Le nerf tegumental commence également ici. Ce nerf reçoit les informations sensorielles des soies, sur le dessus de l'épicrâne.

VI. PARADIGMES D'APPRENTISSAGES ASSOCIATIFS EXISTANT CHEZ LA DROSOPHILE

Depuis la moitié du 20^e siècle, de nombreux paradigmes de conditionnement, non-associatifs et associatifs classiques ou opérants, ont été développés chez la drosophile à partir des comportements connus de son répertoire comportemental et des différentes modalités de stimulations sensorielles. Les comportements étudiés peuvent mettre en jeu l'individu dans sa

globalité (comportement d'évitement ou d'attraction dans un olfactomètre par exemple) ou bien n'intéresser qu'un segment corporel observé sur un individu en contention (retrait d'une patte: Booker et Quinn 1981; extension du proboscis: DeJianne *et al.* 1985). Certains paradigmes comme les conditionnements appétitifs visuel et olfactif ont été développés chez la larve (pour revue, voir Gerber et Stocker 2006), mais la plus grande diversité des paradigmes a été développée chez l'adulte, et nous porterons essentiellement notre attention ici sur les paradigmes de conditionnement associatif développés chez l'adulte.

6.1 Paradigmes liés à l'alimentation

En conditions naturelles, une mouche détecte par olfaction la source alimentaire appétitive et s'y dirige en vol en utilisant les stimuli olfactifs et visuels pour se repérer dans l'espace (Frye *et al.* 2003; Budick et Dickinson 2006). Puis elle se pose, explore et goûte le milieu avec les sensilles gustatives de ses pattes antérieures pour détecter les principales caractéristiques de la ressource (sucrée ou amère, concentrée ou peu concentrée) avant d'étendre le proboscis et de l'ingérer si elle est appétitive (pour revue, voir Scott 2005). L'extension du proboscis est une réponse réflexe obtenue en touchant les tarsi des pattes antérieures ou le labellum du proboscis avec une solution sucrée (Inamdar *et al.* 1993). Elle a été utilisée très tôt pour les études liées au goût chez la drosophile (Vaysse et Médioni 1973; Rodrigues et Siddiqi 1981; Vargo et Hirsch 1982; Edgecomb *et al.* 1994). De nombreux paradigmes de conditionnement non-associatifs³⁰ et quelques paradigmes de conditionnements associatifs ont été développés chez la drosophile sur la base de la plasticité de ces comportements alimentaires.

6.1.1 Conditionnement appétitif de préférences olfactives

D'une manière générale, ce conditionnement discriminatif consiste à présenter à un groupe de mouches une odeur conditionnée associée à une solution de saccharose, et une autre odeur non-conditionnée associée à aucun renforcement ou seulement de l'eau. Selon les auteurs, les odeurs peuvent être initialement aversives (Tempel *et al.* 1983; Heisenberg *et al.* 1985; Keene *et al.* 2006) ou attractives (Milosevic 1999; Schwaerzel *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007a, b). Au bout de quelques essais, les mouches apprennent le caractère appétitif de la première odeur et à se déplacer préférentiellement vers cette odeur par rapport à la seconde dans un appareil de test en T (Fig. 5). Les performances d'apprentissage et de mémoire sont

³⁰ Exemples de conditionnements non-associatifs: Habituation et sensibilisation du réflexe d'extension du proboscis (Duer et Quinn 1982; Scheiner *et al.* 2004), Conditionnement de l'excitabilité alimentaire (Holliday et Hirsch 1986; Lofdahl *et al.* 1992; Fresquet 1999), Habituation du réflexe de mouvement des pattes à une odeur appétitive (Booker et Quinn 1981; Chandra et Singh 2005), Adaptation du comportement de choix alimentaire (Shimada *et al.* 1987; Motosaka *et al.* 2007) etc...

mesurées par le nombre de mouches présentes dans l'une et l'autre odeur à la fin du test. Elles prennent donc en compte une réponse liée à la locomotion et sur des groupes de mouches.

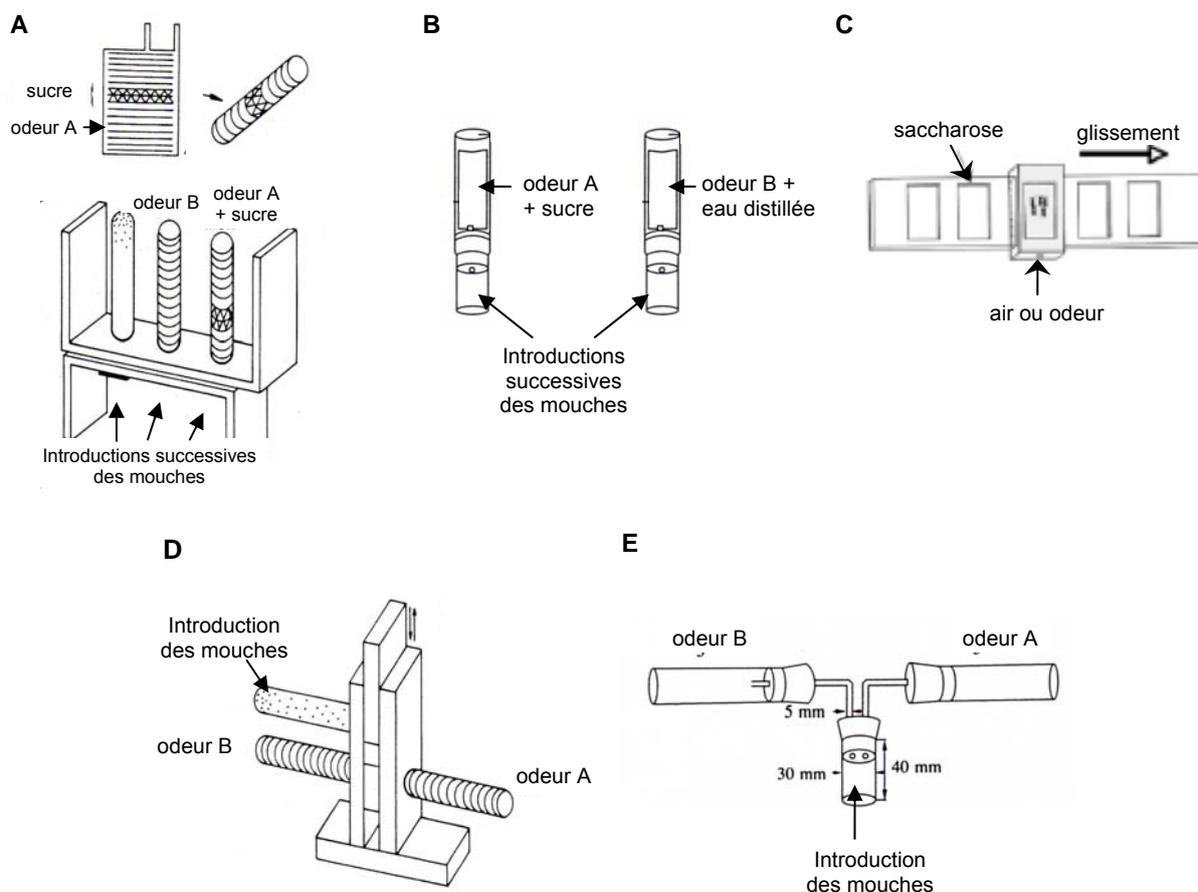


Figure 5: Appareillages de conditionnement et de test pour le paradigme de conditionnement appétitif de préférences olfactives (Tempel *et al.* 1983; Heisenberg *et al.* 1985; Milosevic 1999; Schwaerzel *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007a, b; Keene *et al.* 2006). **A, B, C.** Appareils de conditionnement utilisés (**A**) par Tempel *et al.* et Heisenberg *et al.*, et par Schwaerzel *et al.* et Keene *et al.* avec quelques modifications, (**B**) par Milosevic et (**C**) par Kim *et al.*. Dans les cas de Tempel *et al.*, Heisenberg *et al.* et Milosevic, il n'y a pas de flux d'air: le groupe de mouches explore la surface d'un tube préalablement recouverte d'une solution sucrée odorante sur sa totalité ou sur une zone restreinte, puis d'un autre tube recouvert d'une autre solution odorante non sucrée. Dans le cas de Schwaerzel *et al.* 2003, Keene *et al.* et Kim *et al.*, les odeurs ne sont pas mélangées dans la solution du renforcement sucré et sont apportées via un flux d'air. **D, E.** Appareils de test en T utilisés (**D**) par Tempel *et al.*, Heisenberg *et al.*, Schwaerzel *et al.*, Kim *et al.* et Keene *et al.* (**E**) par Milosevic.

6.1.2 Inhibition conditionnée du phototactisme

Ce conditionnement consiste à placer un groupe de mouches dans un appareil de test en T, où une des branches est illuminée et associée avec une solution de quinine, et l'autre branche non illuminée et non renforcée. Les mouches apprennent à ne plus aller dans la branche

illuminée et à se diriger préférentiellement dans l'autre branche (Le bourg 2004). Il a également été démontré que l'humidité était perçue comme un stimulus aversif dans ce paradigme (Le Bourg 2005).

6.1.3 Inhibition conditionnée du réflexe d'extension du proboscis

Ce conditionnement existe sous deux formes, selon les SI aversifs utilisés: lorsque la drosophile étire son proboscis à la présentation d'une solution sucrée sur les pattes, le premier punit ce réflexe par l'application de chocs électriques de faible intensité (Vaysse et Médioni 1976) et le second par la présentation d'une solution de quinine sur les pattes (Médioni *et al.* 1978; DeJianne *et al.* 1985). Dans les deux cas, la performance comportementale mesurée est l'inhibition du réflexe tarsal d'extension du proboscis. Le conditionnement et le test sont effectués sur des mouches en contention, collées au niveau de leur thorax à l'extrémité d'une épingle, et qui marchent sur un tapis roulant où la solution sucrée apparaît au niveau d'une bandelette (Fig. 6).

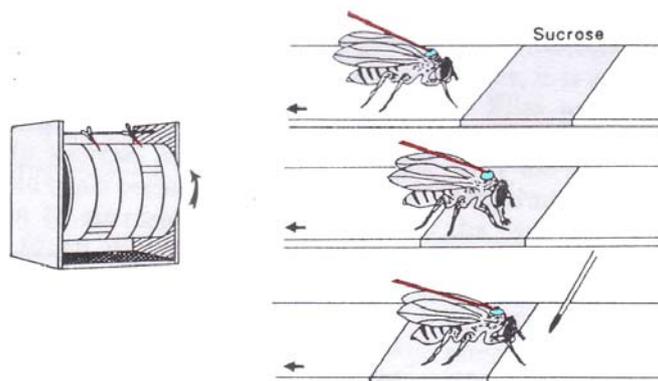


Figure 6: Appareillage de conditionnement de l'inhibition du réflexe d'extension du proboscis. Une mouche, attachée à une aiguille collée (en rouge) au niveau du thorax, marche sur un tapis roulant à 9 mm/s. Elle passe 0.5 s sur la bande imbibée de saccharose, ce qui induit chez les mouches naïves le réflexe d'extension du proboscis. Ce réflexe est alors puni, par exemple par l'application d'une solution de quinine sur les pattes antérieures avec un pinceau (Dejianne *et al.* 1985).

Le conditionnement olfactif de l'ECP, initialement développé chez l'abeille *Apis mellifera* (Bitterman *et al.* 1983), puis chez les papillons *Spodoptera littoralis*, *Heliothis virescens* et *Helicoverpa armigera* (Fan *et al.* 1997; Hartlieb 1996; Skiri *et al.* 2004) et le bourdon *Bombus terrestris* (Laloi *et al.* 1998), n'a jamais été mis au point chez la drosophile. Il aurait été développé chez la blowfly *Cynomia cadaverina* Desvoidy (Frings 1941), mais les changements du comportement obtenus par le conditionnement n'étaient a priori pas liés à de

l'apprentissage associatif mais plutôt à une modification de « l'état d'excitation centrale » (Dethier 1966). Il est certain que des laboratoires avaient déjà essayé de le développer chez la drosophile, comme par exemple celui de J. Medioni durant la thèse de G. Vaysse (1982), mais l'absence de publication à ce sujet laisse penser que ce fut toujours un échec.

6.2 Paradigmes liés à la reproduction

Dans le jeu de la recherche du partenaire sexuel et de la parade sexuelle, les mâles sont plus actifs que les femelles: ils sont attirés par les femelles et les reconnaissent grâce à leurs phéromones sexuelles (hydrocarbures à chaîne lourde, perceptibles à faible portée et par contact) et leur parade est composée d'une chaîne de comportements stéréotypés auxquels la femelle répond essentiellement par l'acceptation ou le rejet (Fig. 7).

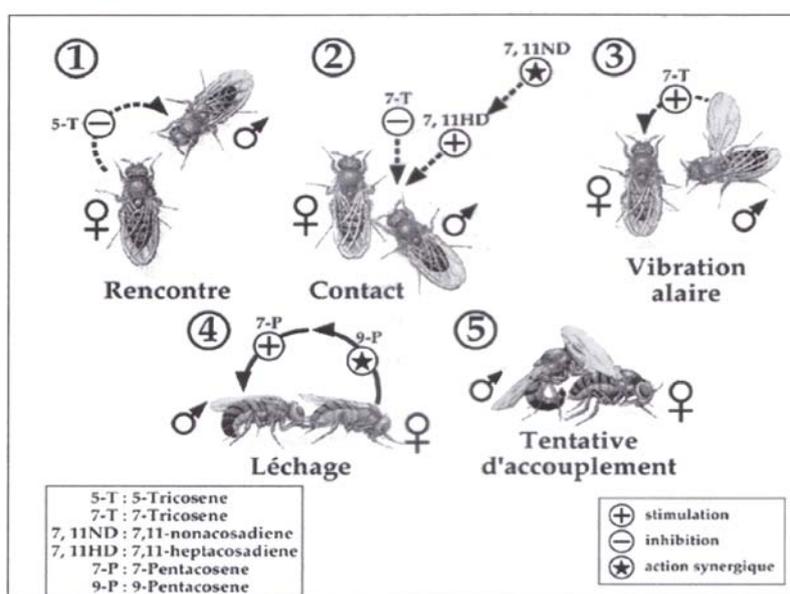


Figure 7: Séquence des comportements pendant la parade sexuelle d'un mâle de drosophile. La séquence comportementale est sous le contrôle des interactions chimiques entre les deux partenaires. La légende à gauche correspond aux hydrocarbures cuticulaires (phéromones sexuelles) produits par les partenaires et celle de droite à leurs effets sur le comportement au cours des différentes phases de la parade (Source: Everaerts C., CNRS UMR 5548).

6.2.1 Inhibition conditionnée de la parade sexuelle

Le conditionnement consiste à présenter à un mâle sexuellement mature des femelles déjà fécondées, qui rejettent ses tentatives de parade sexuelle. Au bout d'un certain nombre de rejets, les mâles apprennent à ne plus réaliser de parade sexuelle envers les femelles en général (Ackerman et Siegel 1986; Ejima *et al.* 2005). Cet apprentissage implique un changement de perception des phéromones des femelles, la phéromone d'agrégation cVA

présente sur les femelles fécondées devenant un signal répulsif dans le cadre de la parade sexuelle chez les mâles conditionnés (Kurtovic *et al.* 2007; Ejima *et al.* 2007)³¹.

6.2.2 Conditionnement de préférence de sites de ponte

Les mouches exposées initialement à un substrat contenant de la quinine ont tendance à éviter ce substrat pendant plusieurs heures même sans la présence de quinine. Il est possible de sélectionner des mouches à bonnes et mauvaises capacités d'apprentissage et leur préférence innée pour un substrat par rapport à un autre au cours des générations successives (Mery et Kawecki 2002, 2004).

6.3 Paradigme lié au contexte de vol: le conditionnement associatif visuel

Ce conditionnement visuel peut être opérant ou classique (Brembs et Heisenberg 2000). Il est réalisé sur des mouches de manière individuelle, placées en contention dans un simulateur de vol (Fig. 8). Cet appareillage est utilisé pour le test de mémorisation de formes, de couleurs, de textures ou de stimuli composés (Liu *et al.* 2006), par des conditionnements associatifs entre ces objets visuels et des signaux olfactifs, thermiques ou vibratoires (pour revue, voir Heisenberg *et al.* 2001; Frye et Dickinson 2004). Ce conditionnement permet également de servir de base pour étudier les apprentissages d'ordre supérieur comme la généralisation (Liu *et al.* 1999; Brembs et Heisenberg 2001).

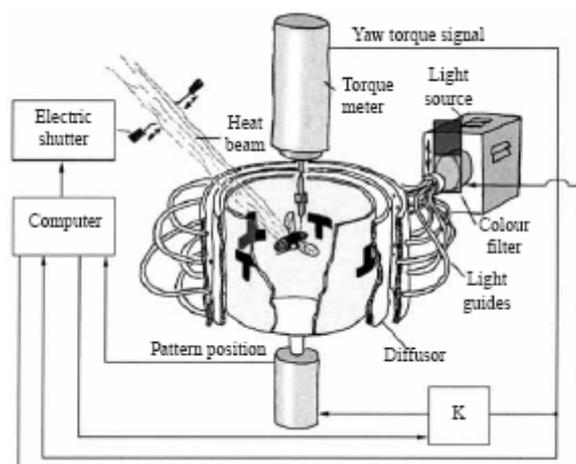


Figure 8: Conditionnement visuel en simulateur de vol. La mouche est en contention au niveau de son thorax au bout de la pointe d'un « torque meter », mesurant les torsions du corps, au centre de deux cylindres concentriques pivotant sur eux-mêmes. Elle peut changer sa direction de « vol » de manière rotatoire, essayer de s'élever ou de plonger, bouger ses pattes et son abdomen. Le cylindre lui offre un panorama où peuvent apparaître différents stimuli visuels (et autres stimuli), et qui bouge en fonction de la direction de son vol (Source: Brembs et Heisenberg 2001).

³¹ Voir dans l'introduction, le paragraphe 4.2.4 a « Communication sociale ».

6.4 Paradigmes de conditionnement aversif, à renforcements négatifs plus ou moins naturels

6.4.1 Conditionnements olfactifs aversifs (choc électrique, mécanique ou thermique)

Ce conditionnement se base sur la capacité des mouches à reconnaître et à fuir une odeur signalant un danger, même si pour l'instant, aucun exemple de cette faculté ne semble avoir été démontré chez la drosophile adulte en conditions naturelles. Un premier protocole de conditionnement olfactif aversif opérant, utilisant les chocs électriques comme renforcement aversif, a été développé (Quinn *et al.* 1974) puis modifié en un conditionnement classique, qui s'est avéré plus efficace (Tully et Quinn 1985).

Dans le cas du conditionnement olfactif aversif classique, des mouches adultes sont exposées successivement à deux odeurs, conditionnées et non-conditionnées, et elles reçoivent des chocs électriques simultanément à la première odeur conditionnée et aucun renforcement à la seconde odeur non-conditionnée (Tully et Quinn 1985). Depuis les 30 dernières années, ce conditionnement associatif a été le plus utilisé chez la drosophile (Preat 1999), et c'est ce dernier paradigme que mon laboratoire d'accueil utilise de manière courante (appareillages: Figs. 12, 13). Il a séduit par la facilité de sa mise en œuvre (étude sur des groupes de mouches, automatisation de l'appareillage) et par la robustesse des résultats. Ainsi, il a permis de nombreuses découvertes au niveau des bases cellulaires, moléculaires et génétiques de l'apprentissage et de la mémoire (pour revue, voir Davis 2005), avec notamment la description de différentes phases de mémoires olfactives (Tully *et al.* 1994; Dudai *et al.* 1988; Isabel *et al.* 2004) et la caractérisation des structures cérébrales impliquées (de Belle et Heisenberg 1994; Zars *et al.* 2000; Pascual et Preat 2001)³².

D'autres conditionnements olfactifs aversifs ont été développés récemment, et qui remplacent le choc électrique par un choc mécanique (Mery et Kawecky 2005) ou par un choc thermique (froid) (Phelan *et al.* 2001). Ce dernier conditionnement au choc thermique a été développé sur des mouches individuelles et non sur des groupes de mouches.

6.4.2 Tâche d'apprentissage spatial

Cette tâche d'apprentissage correspond à un conditionnement associatif opérant où des mouches testées individuellement marchent librement entre deux chambres, mais reçoivent des chocs mécaniques lorsqu'elles entrent dans une des deux chambres. Elles apprennent alors à éviter la chambre associée aux chocs mécaniques, par reconnaissance des repères spatiaux disponibles (Wustmann *et al.* 1996; Wustmann et Heisenberg 1997).

³² Nous y reviendrons dans la partie VII. « Capacités et processus mnésiques de la drosophile découverts à partir du conditionnement olfactif aversif ».

VII. CAPACITES ET PROCESSUS MNESIQUES DE LA DROSOPHILE DECOUVERTS A PARTIR DU CONDITIONNEMENT OLFACTIF AVERSIF.

7.1 Les différentes formes de mémoire

Différentes phases ou formes de mémoire ont été découvertes et décrites à partir du conditionnement olfactif aversif à chocs électriques (pour synthèses, voir Wadell et Quinn 2001; Davis 2005), avec la description de mutants spécifiques des différentes phases de mémoire³³, et en faisant varier le nombre de répétitions (ou essais) de conditionnement, l'intervalle de temps entre les différents essais et l'intervalle de temps entre la phase d'apprentissage et la phase de test (Fig. 9).

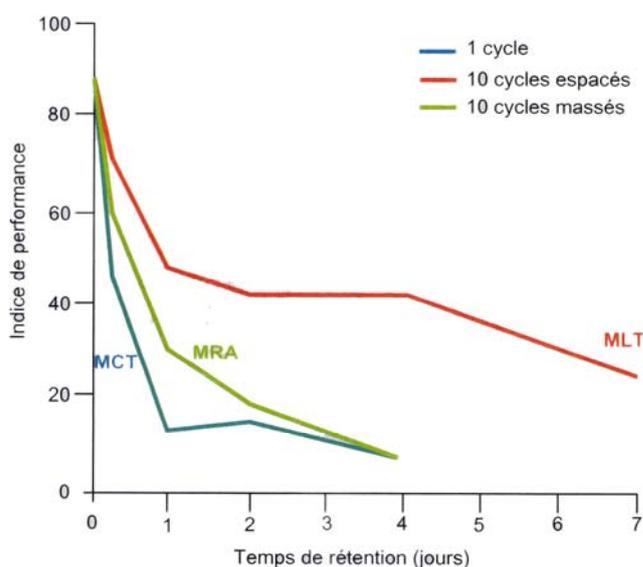


Figure 9: Courbes de rétention des différents types de mémoire. Selon le protocole utilisé, différents types de mémoires peuvent être mis en évidence chez la drosophile: une mémoire à court terme (MCT), une mémoire résistante à l'anesthésie (MRA) et une mémoire à long terme (MLT). Ces mémoires peuvent durer de quelques minutes à plusieurs jours (Source: Tully *et al.* 1994).

La **mémoire à court terme (MCT)** peut être obtenue à partir d'un 1 seul essai de conditionnement. Elle s'étend de quelques secondes à environ 5 heures après l'apprentissage, avec une forte chute dans la première heure. C'est une mémoire labile, non-résistante à l'anesthésie, qui reposerait sur des processus physiologiques rapides et transitoires modifiant l'efficacité synaptique.

³³ Voir plus loin, la partie 7.3 « Description des processus mnésiques».

La **mémoire à moyen terme (MMT)** débute après quelques minutes, est à son apogée à 1h, puis diminue au cours des heures suivantes. Comme la MCT, la MMT est labile.

La **mémoire résistante à l'anesthésie (MRA)** se forme dans la première heure après un conditionnement en un cycle. Ainsi la performance de mémoire mesurée dans les premières heures après l'apprentissage est composite de la MMT et de la MRA. La MRA peut durer jusqu'à au moins 24 h lorsqu'elle est produite par 5 à 10 essais massés, c'est-à-dire lorsque l'apprentissage se fait de manière répétée et intensive, sans période de repos entre les essais (Tully *et al.* 1994). C'est une mémoire consolidée, car résistante à l'anesthésie au froid (Tully *et al.* 1990; Folkers *et al.* 1993). Sa consolidation mettrait en œuvre des processus de maintien en activité de synapses, par un circuit nerveux en boucle (Krashes *et al.* 2007), sans modifications profondes des structures qui nécessiteraient la synthèse de nouvelles protéines (Tully *et al.* 1994). *Radish* est un mutant spécifique de la MRA, présentant une MCT et une mémoire à long terme normales (Folkers *et al.* 1993; Tully *et al.* 1994).

La **mémoire à long terme (MLT)** est une mémoire formée exclusivement par un apprentissage répété et espacé dans le temps, avec une période de repos de 15 min entre 5 à 10 essais successifs (Tully *et al.* 1994). Elle débute au bout de quelques heures et peut durer jusqu'à 7 jours. C'est une mémoire consolidée, résistante à l'anesthésie comme la MRA et qui implique en plus la régulation de l'expression de certains gènes participant à la plasticité synaptique (Tully *et al.* 1994; Yin *et al.* 1994), pouvant potentiellement augmenter le nombre de récepteurs synaptiques, ou remodeler le squelette interne de la cellule nerveuse et augmenter le nombre de synapses par la formation de croissances dendritiques ou de boutons synaptiques, etc... Pour déceler une composante MLT d'une performance mnésique, la MLT peut être bloquée au cours de la phase de mémorisation par l'utilisation d'un inhibiteur de synthèse protéique tel que le cycloheximide (Tully *et al.* 1994).

7.2 Deux modèles de phases de mémoire

Il a longtemps été suggéré un modèle de coexistence entre la MRA et la MLT après le conditionnement espacé, avec l'obtention d'une performance de mémoire composite, et dont les voies des deux composantes MRA et MLT seraient dépendantes de la voie de la MMT (Tully *et al.* 1994; Fig. 10A). Cependant, le mutant *amnésiac* de la MMT a une MRA quasi-normale après un conditionnement en un cycle (Tully *et al.* 1990; Folkers *et al.* 1993), ainsi que le mutant *rutabaga* de la MCT (Isabel *et al.* 2004). Ainsi, il a été démontré que la voie de la MRA était au moins partiellement indépendante de la voie de l'AMPC de la MCT et de la MMT (Isabel *et al.* 2004). De plus, s'il est vrai que le mutant *radish* de la MRA a un score

équivalent à celui des mouches *Canton-S* après conditionnement espacé (Folkers *et al.* 1993; Tully *et al.* 1994), la part de performance non liée à la MLT dans cette mémoire supposée composite devrait être indépendante du gène *radish*.

Les expériences d'Isabel *et al.* (2004) ont permis de proposer un second modèle, de mémoires exclusives et à formations parallèles pour la MRA et la MLT (Fig. 10B). En effet, le conditionnement espacé chez des mouches mutantes où le lobe α est absent (indispensable à la MLT mais non à la MRA; Pascual et Preat 2001) induit une performance nulle et inférieure à la performance de MRA obtenue après un cycle (Isabel *et al.* 2004). Les expériences de conditionnement aversif avec chocs mécaniques (Mery *et al.* 2007) fournissent un autre exemple de l'antagonisme de la MRA et de la MLT, avec une corrélation négative des performances d'apprentissage en ARM et LTM pour des lignées sélectionnées pour leurs capacités d'apprentissage.

Mais la question de la validité de ces deux modèles se pose toujours.³⁴

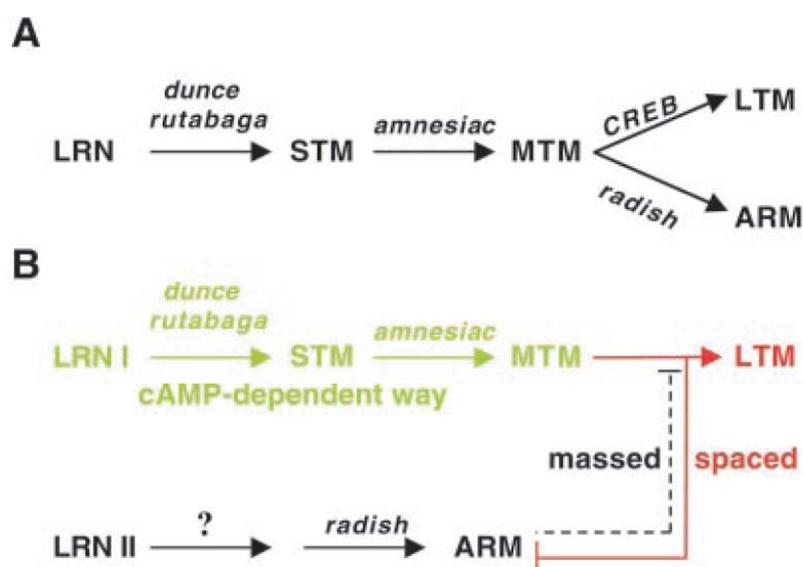


Figure 10: Les deux modèles de phases de mémoire chez la drosophile. **A.** Modèle de coexistence entre la MRA et la MLT après le conditionnement espacé, proposé par Tully *et al.* (1994). **B.** Modèle d'exclusivité des mémoires MRA et MLT, proposé par Isabel *et al.* (2004): la consolidation de la MLT inhiberait la consolidation de la MRA après le conditionnement espacé, et inversement après le conditionnement massé (LRN: learning, STM, MTM et LTM: short-, middle- et long- term memory, ARM: anaesthesia-resistant memory, massed: conditionnement massé, spaced: conditionnement espacé; Source: Isabel *et al.* 2004).

³⁴ Nous en reparlerons dans la Discussion Générale, partie 3.6 « MRA et MLT: deux mémoires exclusives ? ».

7.3 Description des processus mnésiques

7.3.1 Phases d'acquisition et de mémorisation à court terme

Les travaux réalisés à partir du conditionnement olfactif aversif ont permis d'impliquer les CP dans l'apprentissage olfactif. Des mutants anatomiques des CP, tels que le mutant *mushroom body deranged (mbd)* ont été démontrés déficients pour cet apprentissage (Heisenberg *et al.* 1985; Ito *et al.* 1998). Des mutants moléculaires de l'apprentissage, isolés à partir du même conditionnement, impliquent également les CP: ainsi, les mutants d'apprentissage *dunce* (Dudai *et al.* 1976) et *rutabaga* (Livingstone *et al.* 1984) sont mutants de deux gènes exprimés essentiellement dans les CP (Nighorn *et al.* 1991; Han *et al.* 1992). L'ablation des CP par l'application d'hydroxyurée au premier stade larvaire conduit au blocage spécifique des capacités d'apprentissage olfactif, sans défauts de locomotion et de réactivité aux stimuli du conditionnement (choc électrique et odeurs utilisées) (de Belle et Heisenberg 1994).

La zone de convergence du SC (odeur) et du SI (choc électrique) reste indéterminée. Les informations olfactives provenant des lobes antennaires se projettent via le tractus antenno-glomérulaire au niveau des calyces des CP. Les odeurs ont leurs propres signatures au niveau des calyces, par une activation sélective des cellules de Kenyon (Schwaerzel *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004a). Le choc électrique est signalé via des neurones dopaminergiques du neuropile (Schwaerzel *et al.* 2003; Riemensperger *et al.* 2005), pouvant se projeter au niveau des calyces et au niveau de l'ensemble des lobes du CP, ce qui donnerait plusieurs sites potentiels de convergence en amont et au sein des CP (Krashes *et al.* 2007). Les neurones de projection des lobes antennaires conservent de manière transitoire (7 min) une trace de mémoire, accompagnée d'un changement de représentation de l'odeur conditionnée au niveau des lobes antennaires par l'activation de glomérules supplémentaires (Yu *et al.* 2004). Les neurones de projection antennaires acquièrent donc la capacité d'anticiper le choc électrique durant une mémoire à très court terme (Yu *et al.* 2004; Thum *et al.* 2007). Au niveau des CP, les lobes $\alpha\beta$, $\alpha'\beta'$ et γ seraient impliqués de manière parallèle ou redondante pour la formation de la MCT³⁵ moins transitoire (McGuire *et al.* 2001, 2005; Pascual et Preat 2001; Krashes *et al.* 2007), servant de base pour la mémorisation à plus long terme.

En ce qui concerne les processus biochimiques de l'apprentissage et la formation de la MCT, la voie principale semble être celle de l'AMPc. Le mutant *dunce* est mutant de la phosphodiesterase nécessaire au recyclage de l'AMPc (Dudai *et al.* 1976; Chen *et al.* 1986).

³⁵ Il existe cependant des contradictions en fonction des études sur le rôle des lobes γ : voir dans l'introduction, la partie 8.1 « Non-généralisation des processus cognitifs en fonction des paradigmes de conditionnement ».

Le mutant *rutabaga* est lui aussi lié à une mauvaise modulation du niveau d'AMPc mais cette fois au niveau de sa formation, par la mutation de l'enzyme adénylate-cyclase, dont l'activité est dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline et de la protéine G_s (Livingstone *et al.* 1984; Levin *et al.* 1992). La voie de l'AMPc et de la PKA induirait une facilitation pré-synaptique à court terme, en jouant sur des canaux ioniques, induisant une augmentation de la libération en neurotransmetteur (Kandel 2003). D'autres voies biochimiques telles que la voie de la PKC, ont également été impliquées dans la formation de la MCT, avec la découverte de différents gènes non impliqués dans la voie de l'AMPc (gènes *linotte*, *latheo*, *volado*, *fasciclin II*, *leonardo*, *turnip*, *etc...*; pour synthèse, voir Didelot 2006).

7.3.2 Phase de stockage et de consolidation de la mémoire

Le stockage de la MMT et la consolidation de la MRA sont assurées au sein des CP, et ne nécessitent pas les neurones efférents, extrinsèques des CP (Dubnau *et al.* 2001; Krashes *et al.* 2007). Le mutant *amnesiac*, déficient spécifiquement pour les performances de MMT (Quinn *et al.* 1979), est mutant d'un neuropeptide présent essentiellement dans les neurones « DPM » (*Dorsal Paired Medial neurons*) (DeZazzo *et al.* 1999; pour revue, voir Davis 2001). Ces neurones DPM, leur projection vers les lobes $\alpha'\beta'$, et les synapses formées par les neurones des lobes $\alpha'\beta'$ seraient requis pour le stockage de la MMT (Keene *et al.* 2004, 2006; Yu *et al.* 2005; Krashes *et al.* 2007). Krashes *et al.* (2007) ont proposé un modèle d'activité récurrente entre les lobes $\alpha'\beta'$ et les neurones DPM pour la consolidation de cette mémoire. Il pourrait y avoir ensuite un passage de l'information vers les lobes $\alpha\beta$ pour le stockage de la MRA. Il est intéressant de noter que le gène *Amnesiac* est également impliqué dans l'initiation et le maintien de phases de sommeil chez la drosophile (Liu *et al.* 2008), laissant penser que le sommeil pourrait être favorable à cette phase de mémorisation chez la drosophile.

Dans le cas des mémoires MRA et MLT mesurées à 24h, Pascual et Preat (2001) ont montré que les lobes α des CP sont indispensables pour la MLT, grâce au mutant de structure *alpha-lobes-absent (ala)* chez lequel ces lobes verticaux sont absents. Les lobes α par contre ne sont pas indispensables pour la MRA, non affectée chez ce mutant: le stockage et le rappel de la MRA peuvent être assurés au niveau des autres lobes β , soit de manière exclusive, soit de manière redondante avec le lobe α (Pascual et Preat 2001). Une étude récente utilisant l'imagerie calcique a confirmé que la MLT est représentée dans les lobes α des CP (Yu *et al.* 2006).

Au niveau biochimique, la voie de l'AMPc a été également la voie la plus étudiée pour la suite des processus de la mémorisation. Le mutant de MMT *amnesiac* est mutant d'un neuropeptide potentiellement impliqué dans l'activation d'une adénylate cyclase (Feany et Quinn 1995). Dans la cascade biochimique de la voie de l'AMPc, l'AMPc active la protéine

kinase A dont le rôle physiologique dans les processus mnésiques a été démontré par Drain *et al.* 1991. La protéine kinase A agit ensuite sur de nombreuses cibles par son action de phosphorylation. Une des cibles majeures est le facteur de transcription « CREB » (*cAMP-Response Element Binding*), qui pourrait alors induire la transcription de différents gènes potentiellement impliqués dans la consolidation de la MLT (Yin *et al.* 1994; Perazzona *et al.* 2004), avec par exemple la formation de nouvelles synapses ou la restructuration des synapses existantes (Kandel 2003).

Le mutant *crammer* est un mutant déficient spécifiquement pour la MLT (Comas *et al.* 2004). La protéine Crammer, localisée dans les CP et également dans quelques cellules gliales autour de ces structures, est un inhibiteur des cathépsines. Les cellules gliales pourraient donc jouer un rôle dans la mise en place de la MLT via les cathépsines. L'expression du gène *crammer* est inhibée trois heures après l'entraînement, provoquant une activation transitoire des cathépsines, pouvant activer à leur tour des messagers secondaires et/ou stimuler la plasticité synaptique (Comas *et al.* 2004).

Le mutant *radish* est un mutant déficient spécifiquement pour la MRA (Folkers *et al.* 1993, 2006). La protéine est exprimée un peu dans tout le neuropile du cerveau, et en particulier dans l'ensemble des neurones du CP et dans le corps ellipsoïdal du complexe central. L'activation de cette protéine est dépendante de la phosphorylation par la PKA, ce qui suggère son implication dans la voie de l'AMPC, qui relie donc la MRA à la MCT. Il est possible que la fonction de la protéine Radish soit de modifier la morphologie des synapses (par son interaction avec la protéine Rac1) (Folkers *et al.* 2006).

7.3.3 Phase de rappel de la mémoire

Dans le cas de la mémoire à court et moyen terme (incluant la MRA), la phase de rappel implique la transmission synaptique en sortie des CP, au niveau des neurones de projection des lobes $\alpha\beta$ (Dubnau *et al.* 2001; Krashes *et al.* 2007). La sortie des lobes $\alpha\beta$ (et non des lobes γ) est également nécessaire au rappel de la MRA et de la MLT à 24 h (Isabel *et al.* 2004). Plus précisément, la sortie des lobes α serait la principale voie de rappel de la MLT, alors qu'elle ne serait pas indispensable pour le rappel de la MRA, sachant qu'une déficience au niveau d'un des deux lobes α et β est compensée par l'autre lobe (Pascual et Preat 2001). Chez la larve de drosophile, un conditionnement olfactif appétitif induisant de la mémoire dépendante du système CREB (donc potentiellement de la MLT), a également montré que la phase de rappel de cette mémoire dépend des synapses de sortie des CP, alors que les phases d'acquisition et de rétention en sont indépendantes, comme chez l'adulte (Honjo et Furukubo-Tokunaga 2005). Il reste à savoir si les mécanismes sont similaires entre le conditionnement aversif et appétitif, et entre le stade larvaire et le stade adulte. Les processus nerveux liés à la

phase de décision et au contrôle de la réponse motrice sont encore peu connus chez la drosophile. On sait cependant que le complexe central contrôle plusieurs aspects de la locomotion chez l'adulte (voir par exemple Poeck *et al.* 2008), et que la réponse d'attractivité à une odeur est entièrement dépendante de la neurotransmission au niveau des CP, contrairement à la réponse d'évitement des odeurs aversives, qui serait assurée par la corne latérale (Ito *et al.* 1998; Wang *et al.* 2003).

VIII. LIMITES DES METHODES D'INVESTIGATION ACTUELLES ET PERSPECTIVES DU PROJET DE THESE

8.1 Non-généralisation des processus cognitifs en fonction des paradigmes de conditionnement

Certains des résultats trouvés à partir du conditionnement olfactif aversif ne s'appliquent pas aux autres paradigmes de conditionnement, ce qui montre que les capacités mnésiques et leurs déterminants internes sont plus ou moins généralisables en fonction des paradigmes.

8.1.1 Mémoire olfactive: spécificité des mécanismes en fonction du renforcement

Preat (1998) a démontré que le choc électrique pouvait induire une diminution de l'évitement des odeurs chez certains mutants tels que *dunce*, *rutabaga* et *amnesiac*, qui présentent alors un défaut d'olfaction en plus d'un déficit d'apprentissage ou de mémoire. Il est donc nécessaire de vérifier si les mutants d'apprentissage et de mémoire trouvés avec le conditionnement olfactif aux chocs électriques sont également mutants pour d'autres paradigmes.

Par exemple, le mutant *dunce* s'est révélé ne pas être mutant d'apprentissage mais de mémoire à court terme dans le cas du conditionnement olfactif appétitif (Tempel *et al.* 1983; Schwaerzel *et al.* 2003), contrairement au mutant *rutabaga* considéré comme indicateur général de coïncidence des stimuli odeur-choc électrique ou odeur-sucre au niveau des CP (Zars *et al.* 2000; McGuire *et al.* 2003; Mao *et al.* 2004).

Il existerait aussi des différences de durée de mémoire entre les deux paradigmes, avec un apprentissage plus long mais une mémoire plus stable dans le cas du conditionnement appétitif (Tempel *et al.* 1983; Schwaerzel *et al.* 2003). Cela laisse penser que les processus nerveux ne sont pas identiques en fonction du renforcement. Ainsi, il a déjà été démontré que la phase d'apprentissage implique respectivement des neurones octopaminergiques et dopaminergiques pour le conditionnement appétitif et le conditionnement aversif (Schwaerzel *et al.* 2003), et que la MCT serait formée seulement au niveau des cellules de Kenyons dans le

cas du conditionnement aversif et de manière additionnelle au niveau des neurones de projection antennaire dans le cas du conditionnement appétitif (Thum *et al.* 2007). Par contre, il semble que les mécanismes de stockage de la mémoire à moyen terme soient similaires entre les conditionnements olfactifs aversif et appétitif, avec l'implication des lobes $\alpha'\beta'$ (Krashes *et al.* 2007). Actuellement, les différentes formes de mémoires consolidées MRA et MLT dans le contexte appétitif et leurs mécanismes spécifiques sont en cours d'investigation. Récemment, Krashes et Waddell (2008) ont trouvé que la MLT appétitive, pourtant semblable à bien des égards à la MLT aversive, est complètement déficiente chez le mutant *radish* alors que ce mutant présente une MLT aversive normale.

Vu ces découvertes, on peut se demander si la drosophile possède des mécanismes spécifiques du caractère positif ou aversif du conditionnement (avec une certaine capacité de généralisation) ou si ces mécanismes sont spécifiques des stimuli. Dans le cas du paradigme de conditionnement olfactif aversif, les conditionnements utilisant les renforcements par chocs électriques et mécaniques semblent donner des résultats similaires pour les formes de mémoires consolidées (Mery et Kawecki 2005). Pour l'instant, les mécanismes de mémorisation n'ont pas été étudiés avec le renforcement par choc thermique. Enfin, dans le cas du paradigme de conditionnement olfactif appétitif, aucun conditionnement n'a essayé pour l'instant de faire varier la nature du renforcement positif (saccharose).

NB: la spécificité des processus de mémorisation en fonction des contextes d'apprentissage pourrait être considérée comme un principe important, généralisable à d'autres modèles expérimentaux et donc conservée dans l'évolution. Ainsi, la spécificité des neurotransmetteurs dopamine et octopamine en fonction des renforcements a été retrouvé chez d'autres insectes comme l'abeille et le grillon *Gryllus bimaculatus*, avec l'implication de l'octopamine dans les conditionnements olfactifs appétitifs (abeille: Hammer et Menzel 1998; Hammer 1993; Menzel *et al.* 1999; grillon: Unoki *et al.* 2005) et visuel appétitif chez le grillon (Unoki *et al.* 2006), et l'implication de la dopamine dans les conditionnements olfactifs aversifs (abeille: Vergoz *et al.* 2007 ; grillon: Unoki *et al.* 2005) et visuel aversif chez le grillon (Unoki *et al.* 2006).

8.1.2 Mémoire olfactive: spécificité des mécanismes en fonction des odeurs ?

Il est important de vérifier si les mécanismes mnésiques dépendent des odeurs employées. On sait déjà que le traitement supérieur des odeurs attractives et aversives, et les comportements d'attraction ou d'évitement associés, n'est pas effectué par les mêmes structures: l'attractivité est dépendante des CP alors que la répulsivité est dépendante de la corne latérale (Wang *et al.* 2003). Dans le cas du paradigme de conditionnement olfactif aversif avec choc électrique, trois odeurs aversives sont principalement utilisées - l'octanol, le

méthylcyclohexanol et le benzaldéhyde. Récemment il a été découvert que les processus de mémorisation sont différents en fonction de ces odeurs: le benzaldéhyde ne serait pas perçu uniquement au niveau des antennes et des palpes maxillaires, mais également par une voie sensorielle particulière liée à des soies présentes sur les pattes et/ou le labellum, partie distale du proboscis. Les neurones DPM sont impliqués dans la phase d'apprentissage pour cette odeur mais pas pour les deux autres, pour lesquelles ils sont impliqués dans la phase de MTM et de consolidation; en outre, le mutant *amnesiac* est seulement mutant de MTM pour l'octanol alors qu'il serait mutant d'apprentissage pour le méthylcyclohexanol, mais pas au niveau des neurones DPM (Keene *et al.* 2004; Preat 2004). De plus, certains mécanismes restent sujets à des contradictions en fonction des études, comme par exemple pour l'implication du lobe γ dans la formation de la MCT (Zars *et al.* 2000; McGuire *et al.* 2001, 2005; Pascual et Preat 2001) et la stabilisation de la MMT et la MRA (Isabel *et al.* 2004 ; Dubnau *et al.* 2001; McGuire *et al.* 2001; Schwaerzel *et al.* 2002 ; Davis 2005). Selon Krashes *et al.* (2007), leur implication pourrait dépendre des odeurs employées pour le conditionnement, avec la possibilité que les neurones du lobe γ répondent à des odeurs comme les phéromones, ayant une signification écologique importante pour la mouche. Il serait intéressant d'étudier la pression évolutive liée à ces différences de réseaux et de cascades moléculaires en fonction des odeurs.

Pour comparer efficacement les conditionnements aversif et appétitif, les laboratoires utilisent un même lot d'odeurs. Certains laboratoires utilisent les odeurs initialement aversives employées habituellement dans le conditionnement aversif (octanol *vs* méthylcyclohexanol: Tempel *et al.* 1983; Heisenberg *et al.* 1985; Keene *et al.* 2006; Krashes *et al.* 2007), et d'autres utilisent des odeurs initialement attractives, par volonté de se rapprocher de conditions naturelles et potentiellement plus propices au conditionnement appétitif (éthanol *vs* acide acétique: Milosevic 1999; éthyl-acétate *vs* isoamyl-acétate: Schwaerzel *et al.* 2003; Kim *et al.* 2007a, b; Thum *et al.* 2007). Une étude récente a également essayé le lot d'odeurs benzaldéhyde *vs* éthyl-acétate de manière complémentaire (Thum *et al.* 2007). Il serait nécessaire de vérifier les résultats des comparaisons avec les différents lots d'odeurs pour vérifier dans quelle mesure ils sont généralisables.

8.1.3 Mémoire d'autres modalités sensorielles: spécificité fonctionnelle des structures cérébrales ?

Il a été démontré que les CP ne sont pas indispensables pour les apprentissages visuels, tactiles et moteurs, et semblent donc essentiellement requis pour les apprentissages olfactifs (pour revue, voir Wolf *et al.* 1998; Waddell et Quinn 2001). Pour ces autres modalités sensorielles, ils pourraient cependant être impliqués dans les tâches cognitives plus

complexes, comme c'est le cas pour la généralisation en contexte visuel: si on change la luminosité entre le conditionnement et le test, certains mutants liés aux CP montrent une diminution de leurs performances (Liu *et al.* 1999; pour revue, voir Waddell et Quinn 2001). De même, lors d'un test de choix où des signaux sont en conflits dans un conditionnement visuel aversif, les neurones dopaminergiques des lobes des CP sont impliqués dans la phase initiale (4 premières minutes) mais ensuite la phase d'exécution du choix est indépendante des CP (Tang et Guo 2001; Zhang *et al.* 2007). Il reste à savoir si les CP sont impliqués ou non de manière généralisable pour la consolidation et le stockage des mémoires durables.

- Un des objectifs de mon laboratoire d'accueil auquel devait répondre ma thèse est d'avoir à disposition la maîtrise du paradigme du conditionnement olfactif appétitif en plus du conditionnement aversif, pour effectuer les comparaisons entre les deux paradigmes de manière systématique, notamment pour l'étude de la mémoire à long terme.

8.2 Développement de la technique d'imagerie pour l'investigation des circuits nerveux

Chez la drosophile, deux techniques principales et complémentaires permettent d'étudier les circuits nerveux impliqués dans une tâche mnésique:

La première est la technique du mutant *shibire*. La protéine Shibire est une protéine mutante qui inhibe la transmission synaptique et agit de manière dominante même en présence de l'allèle sauvage. Grâce à l'expression génétique dirigée de la protéine par le système Gal4-UAS et à l'activité thermo-dépendante de la protéine, active à 30°C et inactive à 20°C, il est possible de bloquer l'activité synaptique de neurones dans une région précise du cerveau et à une période précise de la phase de mémorisation (pour son utilisation, voir par exemple Isabel *et al.* 2004). Ainsi, on peut déterminer l'implication spatio-temporelle de neurones en mesurant lors du test le déficit de performances provoqué par leur absence d'activité.

La technique d'imagerie calcique facilite cette démarche par la visualisation en directe de l'activité nerveuse impliquée dans la tâche mnésique. L'imagerie calcique est basée sur un mécanisme de détection du calcium présent dans le cytoplasme de la cellule nerveuse. L'activation d'un neurone induisant un flux entrant de calcium dans son cytoplasme, l'imagerie permet de suivre le trajet de l'activité neuronale impliqué dans une tâche mnésique. L'imagerie utilise par exemple l'expression dirigée de l'indicateur calcique G-CaMP, dérivé de la protéine fluorescente GFP (*green fluorescent protein*) qui fixe le calcium (mais d'autres rapporteurs sont possibles, tels que cameleon, tn-xl, etc...). La fluorescence est en générale observée sous microscopes à fluorescence classique ou biphoton.

L'imagerie fonctionnelle a permis de visualiser sur des drosophiles *in vivo* l'activité neuronale dans le contexte de conditionnement olfactif aversif par choc électrique, pendant les phases d'olfaction, d'apprentissage ou de mémorisation à court et moyen terme (voir par exemple Wang *et al.* 2003, 2004a; Riemensperger *et al.* 2005; Krashes *et al.* 2007). Riemensperger *et al.* (2005) ont été les premiers à montrer qu'il était possible d'utiliser l'imagerie calcique *in vivo* pendant le conditionnement aversif avec chocs électriques, car ceux-ci n'induisaient pas d'activité non-spécifique de la réponse calcique des neurones du cerveau. Une autre méthode d'imagerie calcique développée récemment par Martin *et al.* (2007), appelée imagerie par bioluminescence, est basée sur un autre marqueur GFP-aequorin. C'est une protéine sensible au calcium, qui, en présence de son co-facteur, la coelentérazine, émet de la lumière (un photon) lors du changement de concentration calcique de la cellule. Cette technique aurait l'avantage d'être peu invasive et non toxique, pour enregistrer l'activité neuronale sur des drosophiles *in-vivo* et sur de très longues périodes (jusqu'à 48 heures).

Ces deux techniques d'imagerie nécessitent tout de même d'avoir accès au cerveau, sur une drosophile en contention et dont la cuticule recouvrant le cerveau a été ôtée. Il serait important de pouvoir vérifier que cette situation reste propice à de l'apprentissage et de la mémorisation... De plus, pour visualiser la phase de rappel, il pourrait être important de placer la mouche dans une situation où elle peut effectuer sa réponse conditionnée. Cependant, les performances de mémoire au niveau comportemental ne sont pas mesurables dans le cas du conditionnement olfactif aversif et des autres paradigmes où la réponse motrice implique la mobilité de la mouche (locomotion). Obtient-on des résultats similaires sur des groupes de mouches ou sur des mouches individuelles ? sur des mouches individuelles libres de locomotion ou en contention ?

Les paradigmes d'apprentissage pouvant être utilisés dans cette perspective d'imagerie doivent impliquer une réponse comportementale sur un segment corporel de la mouche, comme par exemple l'extension du proboscis ou le placement des pattes. Ainsi, le conditionnement olfactif de l'extension du proboscis sur des abeilles en contention a permis d'appliquer très tôt la technique d'imagerie pour observer *in vivo* l'activité neuronale durant les phases d'apprentissage et de rappel de la mémoire appétitive (Faber *et al.* 1999).

- Un des objectifs actuels de mon laboratoire d'accueil est de se munir de la technique d'imagerie calcique et de maîtriser des paradigmes de conditionnement olfactif aversif et appétitif adaptés à la situation d'imagerie. Ainsi, le développement du conditionnement olfactif de l'extension du proboscis chez la drosophile serait un atout important pour le laboratoire.

8.3 Mesures individuelles ou en groupe des performances mnésiques chez la drosophile

Ce sujet a suscité un débat quelque peu envenimé dans les années 1980 entre différents laboratoires travaillant sur l'apprentissage chez la drosophile. L'article de Holliday et Hirsch (1986) et les répliques de McGuire (1986) et de Tully (1986) en sont un bon exemple.

L'apprentissage et la mémorisation étant forcément individuelles, il semble a priori plus logique de tester les capacités de manière individuelle lorsque celles-ci ne sont pas censées impliquer un contexte social. C'est le cas de la plupart des études réalisées en laboratoire, sur les vertébrés et les invertébrés. Ainsi, le paradigme de conditionnement individuel de l'extension du proboscis établi chez l'abeille (Bitterman *et al.* 1983) a permis les premières avancées dans l'étude des bases nerveuses de la plasticité du comportement, essentiellement par des approches d'électrophysiologie. Certains drosophilistes se sont inspirés du modèle abeille pour développer des paradigmes de conditionnement individuel chez la drosophile (voir par exemple Vaysse et Médioni 1976; Vaysse 1982; Platt *et al.* 1980; Holliday et Hirsch 1986). D'autres ont développé des paradigmes de conditionnement et de test en groupe, moins fastidieux et plus rapides, qui permettent de réaliser les longues expériences de criblages génétiques (Quinn *et al.* 1974; Tully et Quinn 1985). Les paradigmes individuels ont l'avantage de mesurer les performances individuelles et la variabilité entre les individus, mais sont limitants pour les petits animaux comme la drosophile pour l'étude des bases génétiques du comportement, qui demande l'amplification des effectifs. Tully (1986) discutent le fait que les mesures individuelles ne sont pas nécessaires pour l'étude des effets de mutation sur gène unique, d'autant plus que la robustesse et la reproductibilité des résultats permet de penser que la variabilité individuelle n'est pas un élément important puisqu'elle paraît constante. Phelan *et al.* (1998) ont tout de même vérifié que les individus apprenaient dans le cadre du conditionnement opérant de Quinn *et al.* (1974) en l'adaptant pour conditionner et tester des mouches individuellement. Ces auteurs affirment (peut-être un peu trop rapidement) que le comportement individuel n'est pas influencé par les autres mouches et que la probabilité de faire un choix correct est similaire pour l'ensemble des individus conditionnés en groupe. Ainsi, les paradigmes de conditionnement olfactif aversif utilisés actuellement en groupe supposent que les mouches sont semblables, cette idée paraissant d'autant plus probable que la drosophile a souvent été considérée comme un insecte solitaire.

Cependant, ces tests de l'apprentissage en groupe chez la drosophile suscitent toujours des questionnements de la part de la communauté scientifique sur la fiabilité de cette démarche. Comme nous l'avons décrit précédemment³⁶, les mouches interagissent lorsqu'elles sont en

³⁶ Voir dans l'introduction, la partie 4.2 « Caractérisation du contexte écologique de vie de la drosophile: une vie solitaire ou sociale chez la drosophile ? »

groupe. De plus, un certain nombre d'études ont montré que l'analyse du comportement sur des mouches en groupe ou testées individuellement ne donne pas la même information, avec l'émergence de comportements individuels en groupe (Connolly 1968; Hay 1972, 1973; Higgins *et al.* 2005). Connolly (1968) a par exemple démontré de la facilitation sociale dans le comportement individuel de toilettage (*preening*), avec une augmentation de la fréquence de ce comportement chez les mâles et les femelles lorsqu'ils sont en groupe, sans interaction directe entre les mouches. Hay (1973) a montré des différences dans le comportement social entre différentes populations de mouches, qu'il a interprété comme un résultat de la pression de sélection génétique et de conditions d'élevage. Le contexte social influence aussi le rythme circadien des individus au sein du groupe (Levine *et al.* 2002), qui peut être à l'origine de variation d'activité entre différents groupes. Dans le cadre de l'étude épigénétique du comportement, une étude récente montre que le phénotype comportemental d'un groupe de mouches dépend de façon non négligeable des individus qui le composent, même dans le cas d'individus génétiquement identiques (Higgins *et al.* 2005). Ils montrent ainsi que les comportements des individus peuvent être autant influencés génétiquement que par leur environnement social, et suggèrent que les approches de neuro-génétique-moléculaire doivent analyser le comportement au niveau individuel et au niveau du groupe pour être complet et éviter des erreurs d'interprétation.

Peut-on être sûr dans ces conditions que les mesures de performances globales de groupes ne soient pas influencées et biaisées par des interactions entre les mouches ? Les performances individuelles sont-elles similaires à celles du groupe ou existe-t-il une performance spécifique du groupe ?

De plus, la mémoire est principalement accessible par le rappel, et une approche indispensable dans le cadre de l'étude du rappel de la mémoire est de décrire précisément la réponse conditionnée. L'analyse individuelle permet d'avoir accès à de nombreux paramètres encore inaccessibles en groupe pour analyser les comportements liés au rappel, et permettrait de caractériser les réponses comportementales en fonction du type de mémoire.

- Cette analyse constitue un troisième objectif de ma thèse. Répondre à ces questions sur les mouches « sauvages » (servant de contrôle pour tester les mutants) permettrait d'assurer les bases des découvertes déjà réalisées sur la drosophile à partir du conditionnement olfactif aversif et/ou de remettre en question certaines démarches, notamment pour la recherche des mutants de mémoire dont le déficit de performance pourrait être lié à une influence des interactions sociales, et d'analyser plus finement la réponse conditionnée.

8.4 Mon projet de thèse

Pour répondre à ces différents objectifs du laboratoire, mon projet de thèse a été divisé en trois projets distincts:

Le premier projet a consisté au développement du paradigme de conditionnement olfactif appétitif de l'extension du proboscis chez la drosophile. Ce projet répond à différents besoins de mon laboratoire: premièrement, ce conditionnement associatif où la drosophile est en contention pourra servir de base pour développer l'imagerie *in-vivo*. Deuxièmement, il permettra de tester les performances individuelles des mutants d'apprentissage et de mémoire dans un autre contexte d'apprentissage que le conditionnement aversif et pour une autre réponse comportementale que la réponse de préférence d'attractivité.

Le second projet a visé au développement du paradigme de conditionnement olfactif appétitif de l'attractivité, en répondant à certaines exigences d'automatisation du dispositif expérimental et d'homogénéisation avec celui du conditionnement aversif. Ce paradigme devra permettre de comparer de manière fine les processus mnésiques des individus dans les deux contextes aversif et appétitif.

Le troisième projet a consisté en l'analyse comparative des performances en groupe et en individuel dans le cadre du paradigme de conditionnement olfactif aversif, notamment en comparant les effets du conditionnement et du test sur des groupes de mouches et sur des mouches individuelles, et en caractérisant la réponse conditionnée individuelle pour les différents types de mémoire.

MATERIELS ET METHODES GENERAUX

MATERIELS ET METHODES GENERAUX

Les protocoles spécifiques à chaque expérience sont indiqués dans les résultats.

I. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1 Souches de drosophiles

Les drosophiles utilisées pour l'ensemble des expérimentations sont des mouches adultes de l'espèce *Drosophila melanogaster* (Meigen, Diptère, Drosophilidae) et de la souche *Canton-Special* (CS), souche sauvage communément considérée comme référence au laboratoire, à part le fait que son isolation en laboratoire peut induire des dérives génétiques. Quelques souches de mouches mutantes ont également été utilisées, dont le mutant d'apprentissage *rutabaga* (*rut²⁰⁸⁰*) et un mutant aux yeux oranges *MB247* utilisé dans le cadre d'expériences où il était nécessaire de distinguer les mouches. Cette dernière souche porte un « driver » Gal4 s'exprimant au niveau des corps pédonculés, mais l'insertion de ce driver n'est pas censée affecter les mécanismes d'apprentissage et de mémorisation. Le mutant *crammer* a également commencé à être testé en individuel dans le cadre du paradigme de conditionnement aversif. L'ensemble des souches proviennent du stock du laboratoire de T. Preat, sauf pour le premier projet de mise au point de l'ECP où deux autres souches de CS, ont également été testées (« CS G » et « CS K ») provenant respectivement des laboratoires de Cahir O'Kane, University of Cambridge - England, et de Kyung-An Han, Pennsylvania State University).

1.2 Elevage

Les drosophiles sont élevées dans des tubes en verre de 25 ml dans le cadre de l'ECP, et en bouteilles plastiques de 175 ml dans le cadre du conditionnement aversif, sur du milieu de nourriture standard constitué de farine de maïs, de levure de bière, de sucre, d'agar et de fongicide. Le stock est maintenu dans des étuves thermorégulées à 18°C, sans conditions particulières d'éclairage. Pour répondre aux besoins des expérimentations, on laisse pondre les adultes pendant 3 jours dans le cadre de l'ECP et pendant 4 à 5 jours dans le cadre du conditionnement aversif, puis on les retire de manière à obtenir une synchronisation des émergences avec les expérimentations et un nombre moyen de 30-40 mouches par tube dans le cadre de l'ECP, et 70-80 dans le cadre du conditionnement aversif. En effet, la densité des drosophiles dans les tubes d'élevage doit rester relativement faible et constante pour ne pas trop appauvrir le milieu nutritif sur lequel vont se développer les larves, limiter la quantité de ponte et donc limiter la compétition larvaire. Ce paramètre a été d'autant plus important à

prendre en compte dans le premier projet de développement de l'ECP car la compétition larvaire aurait entraîné une trop forte variation de la taille des individus émergents. La « standardisation » du paramètre de la taille des individus a ainsi facilité la manipulation lors de la mise en contention des individus.

Au bout de 20 jours environ à 18°C, les premiers imagos émergent de leur pupes.

II. MATERIELS ET METHODES POUR LE PARADIGME D'EXTENSION CONDITIONNEE DU PROBOSCIS (PROJET N°1)

Le protocole décrit ci-dessous a été élaboré durant mon stage de DEA au Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés (LNCI) à Bures-sur-Yvette, sous l'encadrement de Laure Kaiser et de Thomas Preat (Chabaud 2003, DEA). Nous nous sommes basés sur le protocole d'ECP couramment employé chez l'abeille au LNCI (Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 1995), en adaptant certains paramètres du conditionnement à la drosophile, soit de manière empirique à l'aide des protocoles existants chez la drosophile, soit par des expériences préliminaires.

2.1 Préparation des individus à l'expérimentation

Au jour d'éclosion des pupes, les individus émergents sont prélevés et placés sur du milieu standard frais, directement dans la pièce expérimentale, thermo et hygro-régulée (25°C et 80% d'humidité relative), ainsi qu'avec un contrôle de la photopériode 12-12 h. Elles sont maintenues ainsi pendant leurs premières 24h de vie d'adulte, pendant lesquelles les structures nerveuses adultes finissent leur développement. Au jour du conditionnement, les individus seront âgés de 2-3 jours: les structures nerveuses liées à l'olfaction seront arrivées à complète maturation (Devaud *et al.* 2003) et c'est un âge où les performances d'apprentissage sont bonnes en conditionnement olfactif aversif (Tully et Quinn 1985).

2.1.1 Le sexe

Seules les femelles ont été utilisées parce que les mâles sont connus pour être moins résistants que les femelles au jeûne et à la manipulation (Vaysse et Médioni 1973). Or la mise en contention et le maintien en contention sont des étapes clés du conditionnement où la manipulation est potentiellement génératrice de stress. Le second avantage de n'utiliser qu'un seul sexe est de limiter la variation de taille entre les individus, les mâles étant souvent plus petits en taille que les femelles. Il existe également un dimorphisme sexuel au niveau des sensilles des pattes : les mâles possèdent un plus grand nombre de sensilles que les femelles,

mais il leur manque un type de sensille spécifique des femelles ne répondant qu'aux sucres (Meunier *et al.* 2000). Les femelles deviennent sexuellement matures seulement au bout de 8-12 h après émergence (dans le cas d'un élevage à 18°C). Le prélèvement se faisant ici à l'émergence, les femelles sont donc vierges. Nous avons fait ce choix pour homogénéiser l'expérience des femelles et assurer une bonne motivation alimentaire. En effet, les femelles montrent des différences de comportements alimentaires lorsqu'elles sont vierges ou qu'elles portent des œufs fécondés: les œufs fécondés ont tendance à encombrer leur abdomen et limitent la quantité de liquide pouvant être ingérée (Edgecomb *et al.* 1994). De plus, les femelles fécondées ont tendance à modifier leur régime alimentaire, privilégiant les ressources nutritives à base protéinique par rapport à un régime initialement glucidique (Chapman 1998). Ce changement pourrait peut-être diminuer la motivation alimentaire pour le sucre utilisé comme renforcement dans notre paradigme de conditionnement appétitif. Enfin, on peut imaginer un conflit de motivation entre la motivation à se nourrir (pour la survie de l'individu) et la motivation à pondre (pour la survie de la progéniture), comme c'est le cas chez la guêpe parasite *Microplitis croceipes* (Braconidae) (Lewis et Takasu 1990).

2.1.2 La mise à jeun

Les travaux chez la drosophile utilisaient entre 20 et 24 h de jeûne pour les différentes investigations nécessitant de mettre les mouches en état de motivation alimentaire. Lors d'une expérimentation préliminaire réalisée durant mon DEA (Chabaud 2003), nous avons déterminé qu'une durée de jeûne de 24 h était plus adaptée que les 5 h habituellement utilisées pour l'abeille.³⁷

Une dizaine de mouches est donc placée pour 24 h dans un tube de jeûne comprenant du coton (0.6 g), humidifié avec 5 ml d'eau minérale.

2.1.3 La mise en contention

15 à 45 min avant leur conditionnement, les femelles sont mises en contention individuellement au bout d'un cône de propipette de 1 ml, en suivant une procédure adaptée de celle de Vargo et Hirsch (1982): on laisse monter la mouche dans le cône par géotaxie et phototaxie puis on l'aide à finir son chemin jusqu'à l'extrémité du cône en soufflant très légèrement à l'aide d'un pneumocapteur. L'extrémité du cône a été préalablement coupée en biais, en vérifiant que l'ouverture était adaptée à la mouche que l'on veut mettre en contention, pour ne laisser sortir que la tête et les deux pattes antérieures. Le thorax est coincé

³⁷ Nous avons tenté cette expérience car les drosophiles montraient parfois des extensions spontanées du proboscis avec le jeûne de 24 h, et nous voulions savoir si c'était lié à la durée du jeûne. Le résultat était que les mouches en montraient toujours après le jeûne de 5 h, mais par contre leur motivation alimentaire n'était plus assez forte pour prendre le stimulus inconditionnel.

par l'embouchure du cône et un morceau de coton est placé derrière la mouche pour qu'elle ne puisse pas reculer et se retirer de la contention. Avec cette procédure, il n'est pas nécessaire d'anesthésier la drosophile, un paramètre qui aurait pu perturber les capacités d'apprentissage.

Le cône portant la mouche en contention est ensuite positionné et attaché à l'horizontal sur un support en plexiglas confectionné par l'atelier du LNCI, de manière à observer la mouche de profil sous une loupe binoculaire.

2.2 Choix des stimuli conditionnel et inconditionnel

2.2.1 Stimulus inconditionnel (SI)

Pour le SI gustatif, nous avons choisi une solution de saccharose, comme utilisée pour le conditionnement de l'abeille (Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 1995). Le saccharose est également utilisé comme sucre de référence dans un certain nombre d'études chez la drosophile (Edgecomb *et al.* 1994, Vaysse 1982) et les voies de perception du saccharose sont déjà bien connues (pour revue, voir Scott 2005). Nous avons tout de même hésité à utiliser un autre disaccharide: le tréhalose. L'intérêt du tréhalose par rapport au saccharose réside dans le fait qu'il est perçu par un récepteur spécifique (GR5a, Dahanukar *et al.* 2001), ce qui aurait facilité la démarche d'investigation des voies nerveuses de l'apprentissage par la suite. Comme pour la majorité des insectes, il constitue la principale forme de sucre de l'hémolymphe (Chapman 1998), et pouvait donc constituer un renforcement intéressant dans le cadre du conditionnement. Cependant, G. Vaysse (1982) avait montré que le saccharose était un meilleur renforcement que le tréhalose, avec une probabilité de réponse d'extension du proboscis plus élevée que pour le tréhalose. Nous avons déterminé la concentration de la solution de saccharose à utiliser par l'établissement d'une gamme de concentration de 0.25 à 1 M (sachant que pour l'abeille la concentration du SI est de 0.3 M; Sandoz *et al.* 1995). Ainsi, nous avons choisi une solution de saccharose à 0.5 M, permettant d'obtenir une motivation alimentaire constante envers le SI sur au moins 5 essais répétés à intervalle de 15 min (période similaire à une phase de conditionnement) chez des mouches à jeun depuis 24 h. La solution sucrée est présentée à la drosophile du bout de la pointe d'un triangle de papier filtre, que l'on imbibe juste avant l'essai de conditionnement. Un papier filtre n'est utilisé qu'une seule fois, il est changé à chaque mouche.

Le stimulus inconditionnel est appliqué sur le labellum (partie distale du proboscis portant des récepteurs gustatifs; Fig.1 art.1). Contrairement aux conditionnements non-associatifs développés chez la drosophile, nous avons choisi d'appliquer la stimulation sucrée directement au niveau du proboscis et non sur les tarsi, pour faciliter la synchronisation des

paramètres pendant la phase de conditionnement. De cette manière, la prise alimentaire est immédiate après stimulation. En effet, au niveau technique il était difficile d'appliquer la languette de papier sous les pattes puis de l'amener sous le proboscis en respectant les faibles délais impartis au protocole de conditionnement. Sur un insecte plus gros comme l'abeille, la procédure habituelle dissocie la stimulation entraînant le réflexe d'extension du proboscis et la récompense alimentaire en appliquant la stimulation d'abord sur l'antenne puis sous le proboscis. Cependant, il est également démontré que la simple stimulation du proboscis peut agir comme renforcement et génère une performance de mémoire similaire à celle obtenue avec la double stimulation antenne-proboscis (Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 2002). Il est cependant important de prendre en compte que les chemins nerveux sont différents entre les deux méthodes, et que la double-stimulation tarse-proboscis semble être un mécanisme plus naturel chez la drosophile qui permettrait peut-être un meilleur traitement de l'information gustative au niveau du SOG.

2.2.2 Stimulus conditionnel (SC)

L'odeur utilisée comme SC est une odeur de banane, dérivée d'un extrait naturel de banane contenant des épices naturels, des composés chimiques spécifiques de l'odeur de banane et de 33% d'alcool (Haarmann & Reimer[®], ref.209725). Les circuits nerveux utilisés dans la perception et le traitement de l'odeur de banane étaient déjà bien caractérisés (Stocker 1994; de Bruyne *et al.* 1999; Hallem *et al.* 2004). Nous avons choisi d'utiliser l'odeur de banane naturellement attractive pour les drosophiles, plutôt que les odeurs répulsives habituellement utilisées pour le conditionnement olfactif aversif, car celles-ci pouvaient a priori être moins adaptées à un apprentissage appétitif (Milosevic 1999). Le SC doit théoriquement être neutre au départ, ou plus précisément il ne doit pas déclencher la réponse inconditionnée. Les drosophiles élevées au sein du laboratoire n'ont pas eu d'expérience avec cette odeur, mais nous avons pris soin de vérifier dans les expérimentations que les réponses inconditionnées d'extension du proboscis à l'odeur de banane restaient assez faibles pour visualiser une augmentation des réponses par le conditionnement.

La solution odorante est déposée sur un petit morceau rectangulaire de papier canson (4x5 mm; densité = 200 g/m²), que l'on insère dans une pipette Pasteur, elle-même placée dans un tube à essai en verre fermé avec un bouchon de liège pour éviter que l'odeur ne se disperse avant le conditionnement. Le volume de la solution (6 µl) a été choisi à partir d'expérimentations préliminaires, en vérifiant que la concentration résultante dans le flux d'air ne produisait pas ou peu de pollution d'odeur au niveau de la zone expérimentale (odeur non perceptible en tout cas pour un nez humain) et permettait d'obtenir des réponses conditionnées à l'odeur (Chabaud 2003). La pipette Pasteur contenant la source d'odeur est

changée toutes les 10 mouches (c'est-à-dire, toutes les 15 min, à chaque essai dans le cas du conditionnement espacé).

2.3 Appareillage expérimental (Fig. 11)

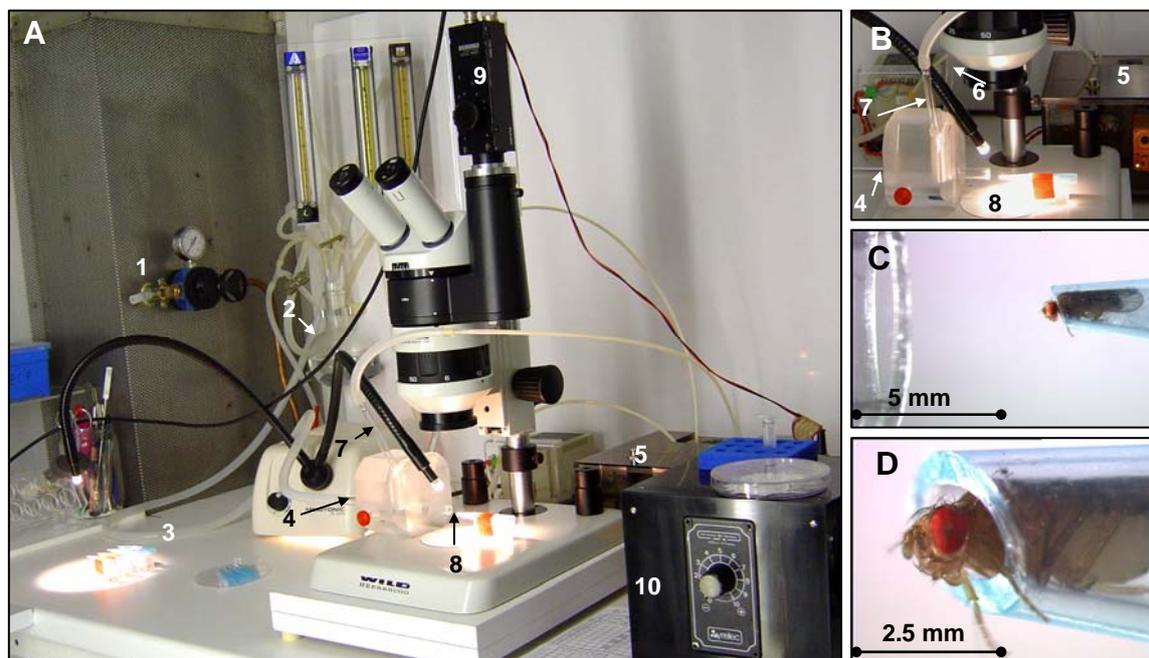


Figure 11: Appareillage expérimental de l'ECP chez la drosophile. A, B. Photos du dispositif de l'ECP, avec l'arrivée d'air comprimé (1), la fiole pour humidifier le flux d'air (2), les mouches en attente sous fibre optique pour les habituer à la luminosité utilisée sous la loupe (3), la voie du flux d'air destiné au conditionnement (140 ml/min) qui se divise vers le flux d'air principal (125 ml/min) arrivant directement au niveau de la buse (4), et le flux d'air secondaire qui passe d'abord dans l'électrovanne (5), ressort soit au niveau de la pipette pasteur vide (6), soit au niveau de la pipette pasteur contenant le papier filtre odorant (7), et rejoint le flux principal au niveau de la buse où les deux pipettes sont introduites. Les mouches (8) sont observées sous loupe binoculaire à un grossissement x20 et filmées grâce à une caméra (9) adaptée à la loupe. Le flux d'air est extrait de la zone expérimentale par (10) un ventilateur inversé placé derrière la mouche. C, D. Photos prises sous loupe binoculaire à un grossissement x10 (C) et x20 (D), d'une drosophile en contention dans un cône de propipette de 1 ml, placée 5 mm en aval de la buse. La mouche en contention a sa tête et ses deux pattes antérieures sorties du cône, et son thorax un peu bombé l'empêche de sortir du cône; un petit bout de coton placé derrière son abdomen, sous ses ailes, l'empêche de se retirer de la contention en arrière.

La mouche en contention est positionnée dans un flux d'air constant de 140 ml/min délivré par un tube en verre (une buse) de 10 mm de diamètre et 4 cm de long, placé 5 mm en avant de la mouche. Par rapport à l'abeille où le flux principal est de 3030 ml/min, le flux à 140 ml/min a été choisi pour se rapprocher des conditions de tests d'olfaction généralement

utilisées chez la drosophile (environ 330 ml/min pour le conditionnement aversif au laboratoire de T. Preat, ou par simple diffusion de l'odeur: voir par exemple Sandoz et al. 2002). Celui-ci provient, dans un premier temps de la thèse, d'un air comprimé provenant de l'air disponible dans le bâtiment. Mais nous ne pouvions pas être assurés de sa pureté, et nous l'avons remplacé par de l'air pur comprimé en bouteille (Alpha gaz 1) durant le début de la thèse. Il est humidifié avant de se diviser en deux voies, un flux principal (125 ml/min) et un flux secondaire (15 ml/min) servant à la stimulation odorante. Le flux secondaire rejoint le flux principal soit par la pipette contenant le papier odorant, soit par une autre pipette vide sans odeur. Une électrovanne à faible latence permet à l'expérimentateur de diriger le flux d'air secondaire vers l'une ou l'autre voie. Les flux se remélangent au niveau de la buse. Cet appareillage a été conçu pour que l'odeur arrive sur la mouche en moins d'une seconde. Un ventilateur inversé est placé derrière la mouche pour extraire l'odeur de la zone expérimentale (système ouvert) afin qu'elle ne pollue pas la pièce expérimentale. L'odeur est évacuée par le système d'aération générale vers l'extérieur du bâtiment.

Au début de chaque expérimentation, la mouche est placée sous la loupe binoculaire pendant 15 à 20 s pour la familiariser à la situation expérimentale. Les mouvements du proboscis sont observés de profil au grossissement x 20, à l'aide d'un éclairage sous fibres optiques. Pour respecter le timing du protocole, nous avons utilisé un métronome et un timer avertissant par un petit signal sonore lorsque les stimuli devaient être présentés à la mouche.

2.4 Protocole de conditionnement et de test

2.4.1 Phase de conditionnement

Un essai de conditionnement consiste à présenter simultanément le SC et le SI. L'arrivée de l'odeur doit cependant devancer l'application de la solution sucrée afin que l'individu apprenne à anticiper celle-ci.

Voici la description d'un essai de conditionnement :

- de 0 à 15 s : habitude de la mouche dans le flux d'air, sous la loupe binoculaire et la lumière des fibres optiques ; observation de l'activité spontanée du proboscis.
- de 15 à 25 s : présentation de l'odeur de banane
- de 15 à 20 s : observation de l'activité du proboscis en réponse à l'odeur
- de 20 à 25 s : stimulation avec le SI du proboscis au niveau du labellum, qui déclenche le réflexe d'extension du proboscis (RI), et récompense alimentaire en laissant boire la solution sucrée à la mouche pendant les 5 dernières secondes de la présentation de l'odeur.

Le délai entre le SC et le SI est ainsi de 5s. C'est un peu plus que pour l'abeille, pour laquelle un délai de 3 s est utilisé (Bitterman *et al.* 1983). Les drosophiles sont soumises à 5 répétitions du conditionnement, avec des temps de « repos » de 15 min entre chaque cycle (au lieu de 10 min pour l'abeille). Ce conditionnement correspond donc à un conditionnement espacé.

Pour vérifier que l'apprentissage a une base associative, le lot de mouches conditionnées est comparé avec un lot pseudo-conditionné, contrôle de la sensibilisation et de l'habituation. La procédure de pseudo-conditionnement consiste à présenter le SC et le SI de manière explicitement non appariée :

- de 0 à 15 s : habituation de la mouche dans le flux d'air, sous la loupe binoculaire et la lumière des fibres optiques ; observation de l'activité spontanée du proboscis.
- de 15 à 25 s : présentation de l'odeur de banane, sans la récompense sucrée
- de 15 à 20 s : observation de l'activité du proboscis en réponse à l'odeur
- à 7.5 min : stimulation avec le SI du proboscis au niveau du labellum et récompense alimentaire pendant 5 secondes.

La trace de 7.5 min entre le SC et le SI correspond au milieu de la période de repos entre deux essais. Ainsi les mouches ne peuvent pas faire l'association entre les deux stimuli, mais peuvent montrer l'influence sur leur comportement d'éventuels apprentissages non-associatifs. Dans mon travail de DEA, j'avais également testé deux autres procédures contrôles sur la base du protocole de conditionnement, avec un lot « odeur seule » (odeur présentée de 15 à 25 s sans le SI) comme test de l'habituation à l'odeur, et un lot « sucre seul » (SI présenté de 20 à 25 s, absence de l'odeur) comme test de la sensibilisation au sucre.

Les réponses à l'odeur observées au cours de la phase de conditionnement permettent de visualiser les performances d'apprentissage via la mémoire à très court terme (les 15 min d'intervalle entre les essais).

Lors d'un essai de conditionnement, pendant les 5 premières secondes de la phase odorante, l'expérimentateur doit approcher le papier imbibé de la solution sucrée vers la mouche pour qu'il soit visible sous la loupe binoculaire et en position pour stimuler le proboscis au moment voulu. Il est possible que ce geste soit perçu par la mouche et qu'il participe à un éventuel conditionnement visuel. Cette possibilité a donc été prise en compte également pour les groupes contrôles pendant la phase de conditionnement, pour lesquels le papier était également présenté durant la stimulation odorante.³⁸

³⁸ On aurait pu également intercaler des essais non renforcés de placement et de présentation visuelle du papier, mais cela aurait considérablement limité le nombre de mouches conditionnées à chaque expérimentation.

2.4.2 Phase de test

La phase de test est effectuée 1 heure après la fin de la phase de conditionnement pour tester la MCT. Elle se déroule de la même manière pour le lot conditionné et le lot contrôle: le SC est présenté pendant 10 s, sans le SI. Les réponses du proboscis sont observées durant les 10 s. Après le test, on vérifie que les mouches font bien le réflexe d'extension du proboscis et prennent la solution sucrée en réponse à la stimulation par le SI sur le labellum. Si les mouches ne répondaient plus, elles étaient écartées de l'analyse (cas de 3 mouches sur l'ensemble des expériences de thèse).

2.4.3 Définition de la réponse conditionnée

La réponse produite par la stimulation du proboscis (ou des tarsi antérieurs) avec la solution de saccharose est un réflexe d'extension du proboscis.

Une mouche conditionnée doit avoir appris à associer l'odeur de banane avec la récompense alimentaire, et doit anticiper l'arrivée de la récompense alimentaire dès la perception de l'odeur. Cette anticipation doit pouvoir être visible au niveau de son comportement. Théoriquement, la RC doit être similaire à la RI pour répondre aux exigences du conditionnement classique, donc la mouche doit répondre à l'odeur conditionnée par une extension du proboscis.

La mouche présente une activité spontanée du proboscis lorsqu'elle est en contention au bout du cône de propipette. Cette activité constitue un bruit de fond à partir duquel la réponse à l'odeur doit être isolée. Pour cela, nous avons comparé l'activité du proboscis observée durant les 5 premières secondes de stimulation odorante (ou sur les 10 s pour le test) avec l'activité spontanée du proboscis observée durant les 15 s qui la précédait. Durant les deux périodes, plusieurs mouvements différents du proboscis peuvent apparaître. Seul le niveau le plus élevé d'extension du proboscis est comptabilisé.

Il y a donc 3 possibilités de résultats pour chaque mouche:

- l'extension pendant l'odeur est plus forte qu'avant l'odeur
- le type d'extension ne change pas avant et pendant l'odeur
- l'extension pendant l'odeur est plus faible qu'avant l'odeur

Nous considérons qu'il y a réponse à l'odeur quand la mouche fait une extension du proboscis durant l'odeur et que ce niveau d'extension est plus élevé que celui présenté avant l'odeur. Ainsi, les deux autres cas (activité inchangée ou plus faible) sont comptabilisés de la même manière, comme une absence de réponse³⁹.

³⁹ NB: le mutant *rutabaga* répondait de manière significative à l'odeur par une diminution de l'activité spontanée. Cela dénotait une marque d'attention et de reconnaissance de l'odeur, mais non de reconnaissance du

Au premier essai de la phase de conditionnement, les drosophiles reçoivent l'odeur avant le sucre donc les réponses observées à ce premier essai ne sont pas encore conditionnées. Elles représentent le niveau de base des réponses initiales à l'odeur. Les réponses observées aux essais suivants sont en théorie conditionnées, mais leur interprétation doit prendre en compte le niveau de base des réponses initiales.

Les réponses du proboscis sont analysées par le pourcentage de mouches qui répondent, par essai de conditionnement et pour chaque groupe de mouches. Ce paramètre est utilisé pour visualiser la courbe d'acquisition. Pour les mouches répondant au moins une fois durant la phase de conditionnement (en ne prenant pas en compte les réponses initiales du premier essai), nous pouvons également caractériser la réponse conditionnée par le nombre de réponses par individu, dans le but d'analyser les performances individuelles d'apprentissage.

Notre définition initiale de la réponse conditionnée (DEA et début de thèse) ne prenait en compte que les extensions « franches » du proboscis, visualisables par le dépliement du proboscis. Mais au fur et à mesure, nous avons affiné nos observations des mouvements du proboscis, et la limite inférieure à prendre en compte dans le niveau d'extension n'était plus vraiment claire. Nous avons donc établi une échelle d'extension du proboscis à 6 niveaux, de l'immobilité jusqu'à l'extension complète (Fig.1 art.1). En ne prenant en compte que les deux ou trois derniers niveaux d'extensions, les résultats d'ECP n'étaient pas reproductibles. Nous avons alors redéfini la réponse conditionnée non pas comme une réponse d'extension mais d'activité du proboscis, et pris en compte l'ensemble des cinq niveaux après l'immobilité⁴⁰.

III. MATERIELS ET METHODES DU PARADIGME DE CONDITIONNEMENT AVERSIF (PROJET N°3)

Le protocole utilisé habituellement au laboratoire est directement adapté du paradigme de conditionnement classique développé par Tully et Quinn (1985).

3.1 Préparation des individus à l'expérimentation

La veille du conditionnement, les mouches émergentes de la journée et de la veille sont récupérées et transférées dans des bouteilles de milieu frais, garnies d'un morceau de mouchoir kleenex, à raison de 60-70 mouches par bouteilles. Le petit détail du mouchoir participe à un objectif principal: contribuer au confort des mouches avant l'expérimentation ! Dans un premier temps, cela permet aux mouches encore jeunes de limiter leur contact avec le

contexte associatif. A noter également que le mutant avait une activité spontanée plus forte que la souche CS, et que cela jouait en partie sur la probabilité de réponse.

⁴⁰ Voir dans « Résultats », Projet N°1, la partie 2.6 « Standardisation du protocole et objectivité des observations: re-définition d'une réponse conditionnée ».

milieu pour éviter qu'elles s'y abîment les ailes, puis le papier contribue à leur sécher les pattes pour le lendemain, lorsqu'elles recevront les chocs électriques. Les bouteilles de mouches émergentes sont placées dans une étuve à 18°C différente de celles des élevages pour éviter les odeurs trop fortes du milieu d'élevage.

Le jour du conditionnement, les mouches sont âgées de 1 à 2 jours. Les expérimentations sont réalisées dans une pièce thermo et hygro-régulée à 25°C et 80% d'humidité relative.

3.2 Stimuli inconditionnel et conditionnels

3.2.1 Stimulus inconditionnel (SI)

Le SI est une série de chocs électriques de faible intensité (impulsions de 60 volts de durée 1.6 s), délivrés au niveau des grilles conductrices dont est tapissé le barillet utilisé pour le conditionnement (Fig. 12). Le choc peut entraîner une altération des capacités locomotrices ou des réponses olfactives juste après le conditionnement chez certains mutants (Preat 1998).

3.2.2 Stimuli conditionnels (SC)

Deux odeurs sont utilisées alternativement comme odeur conditionnée, le conditionnement étant discriminatif. Les odeurs couramment employées au laboratoire, et de manière plus générale dans le conditionnement classique aversif, sont le 4-méthylcyclohexanol (MCH, pureté de 99%, Fluka 66360) et le 3-octanol (OCT, pureté > 95%, Fluka 74878). Respectivement 52 et 58 µl de chaque odeur sont dilués dans 160 ml d'huile de paraffine (Rectapur, VWR international Prod. 24 679.360), soit des concentrations de $3.25 \cdot 10^{-4}$ de MCH et $3.6 \cdot 10^{-4}$ d'OCT. Ces deux alcools sont naturellement répulsifs pour les mouches, mais de manière équivalente aux concentrations utilisées (biais faible ou non systématique vers la même odeur).

3.3 Appareillage expérimental

3.3.1 Dispositif de conditionnement

Le dispositif de conditionnement a été automatisé par l'équipe de T Preat en 2000-2002, dans le cadre de la thèse de F. Petit. Ce dispositif a l'avantage de standardiser les expérimentations et de gagner un temps considérable sur l'ensemble des investigations.

Le barillet (Fig. 12) est constitué de six compartiments de conditionnements recouverts de toute part de grilles électrifiables en cuivre (socle et couvercle compris). Ainsi, les mouches ne peuvent pas échapper aux chocs électriques lors du conditionnement.

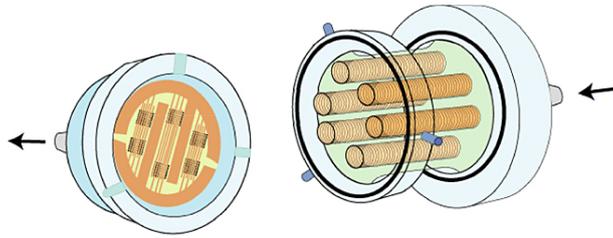


Figure 12: Schéma du barillet de conditionnement utilisé pour le conditionnement olfactif aversif des drosophiles. Le barillet (longueur avec couvercle: 20 cm) est constitué de 6 compartiments recouverts de grilles électrifiables. Lorsque les mouches sont chargées dans les compartiments, le couvercle électrifié (à gauche) est positionné sur le socle (à droite). Les flux d'air odorants ou non circulent dans le barillet selon le sens indiqué par les flèches.

Les barillets portent des fiches électriques sur le socle et sur le couvercle, et le circuit est branché à un générateur de courant situé dans la pièce expérimentale. Ce générateur délivre du courant sur les grilles tapissant l'intérieur des barillets, à l'origine des chocs électriques correspondant au SI.

Chaque barillet est relié en aval à un boîtier d'électrovannes connecté à une paire de bouteilles d'huile. En amont du barillet, une pompe à vide permet d'aspirer via le barillet de l'air soit odorisé provenant d'une des deux bouteilles d'huile, soit de l'air « sans odeur » provenant de la pièce expérimentale, en fonction de la position de l'électrovanne. Le débit est réglé à 2 l/min par barillet, soit environ 330 ml/min pour chaque compartiment.

L'air des bouteilles d'huile est renouvelé par le biais de leur bouchon à tube plongeur, qui par dépression aspire de l'air de la pièce expérimentale et le fait barboter dans l'huile odorisée. Les odeurs sont acheminées vers les compartiments du barillet par une série de tuyaux recouverts de téflon; cette matière ne capte pas ou peu les odeurs et permet d'acheminer successivement les deux odeurs et l'air.

Le générateur de courant électrique et le système à électrovannes délivrant les odeurs sont reliés à un ordinateur de contrôle à l'extérieur de la salle d'expérimentation, et peuvent être pilotés par différents programmes informatiques au choix, en fonction du conditionnement voulu.

3.3.2 Dispositif de test

L'appareillage utilisé habituellement est un appareil de test en T (Fig. 13).

Les tubes de tests sont connectés en amont à une bouteille d'huile odorisée soit avec de l'OCT soit avec du MCH. Le flux d'air est aspiré au niveau de la zone centrale (logette), à un débit de 800 ml/min, soit 400 ml/min par tubes de test. La logette constitue le « point de choix » où convergent les flux des deux odeurs.

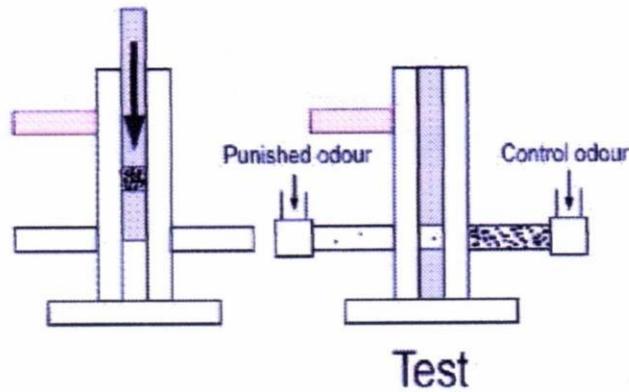


Figure 13: Schéma de l'appareil de test en T utilisé pour le test d'évitement de l'odeur conditionnée. L'appareil de test (longueur: 15 cm) comprend un étage supérieur où les mouches sont introduites, et un étage inférieur où elles sont testées. Un ascenseur central (la logette), maniable par l'expérimentateur, transporte les mouches d'un étage à l'autre. A l'étage inférieur, la logette constitue la partie centrale où s'insèrent les deux tubes de test; ces tubes sont percés de petits trous à leur extrémité pour laisser passer le flux d'air.

3.4 Protocoles de conditionnement et de test

3.4.1 Phase de conditionnement

Le conditionnement étant discriminatif, chaque conditionnement se compose de deux expériences inverses, la première utilisant l'odeur OCT et la seconde l'odeur MCH comme odeur conditionnée. Cela permet d'éviter d'éventuels biais qui ne seraient pas liés à l'association avec les chocs électriques. La seconde expérience est toujours réalisée directement à la suite de la première et dans les mêmes conditions expérimentales.

Pour les deux expériences, la moitié des mouches de chaque bouteille préparée la veille (soit 30 à 40 mouches) sont introduites dans chacun des compartiments du barillet, à l'aide d'un pneumocapteur. Une pièce circulaire à 1 trou permet de cacher 5 compartiments durant le chargement du sixième. Il est nécessaire de tapoter le barillet sur la moquette de la table d'expérimentation pour faire descendre les mouches, retirer la pièce circulaire et fermer le barillet avec le couvercle. Le barillet est ensuite branché sur le flux d'air et le circuit électrique. Lorsque tout est connecté, il ne reste donc plus qu'à lancer le programme à partir de l'ordinateur de contrôle.

Chaque expérience commence par une émission d'air sans odeur pendant 1min30 pour habituer les mouches au flux.

Voici la description d'un essai de conditionnement :

1. de 1min 30s à 2min 30s : émission continue de l'odeur conditionnée sur 60 s, et émission ponctuelle de 12 chocs électriques débutant après 7 s d'émission d'odeur, puis toutes les 5 s.
2. de 2min 30s à 3min 22s : émission d'air, pour éliminer la première odeur du dispositif.
3. de 3min 22s à 4min 22s : émission de la seconde odeur non conditionnée.
4. de 4min 22s à 5min 14s : émission d'air, pour éliminer la seconde odeur du dispositif.

En fonction du type de mémoire que l'on cherche à obtenir, les protocoles de conditionnement varient au niveau du nombre de répétitions des essais et du temps de repos entre les essais successifs:

- MCT/MMT : pour les tests de mémoire à court terme, nous avons utilisé un conditionnement à un seul essai.

- MLT: pour tester la mémoire à long terme, cet essai de conditionnement est répété cinq fois, avec une période de repos de 15 min entre les essais, pendant laquelle de l'air est émis - soit un intervalle de 18min44 entre les essais - (conditionnement espacé).

- MRA: pour tester la mémoire résistante à l'anesthésie, cet essai de conditionnement est également répété cinq fois, mais sans les phases de repos - soit un intervalle de 3min44 entre les essais - (conditionnement massé). Pour rappel, la MRA est également formée après un conditionnement en un seul essai.

Dans un certain nombre d'expériences, nous avons également utilisé un groupe contrôle pseudo-conditionné inversé (backward conditioning), pour lequel le SC est présenté après le SI et de manière non appariée (SC après SI). Pour le contrôle du conditionnement espacé, le meilleur protocole de pseudo-conditionnement aurait été de présenter le choc électrique à mi-distance entre deux essais, c'est-à-dire au milieu de la période de repos (Bitterman *et al.* 1983). Mais pour le contrôle du conditionnement massé, cette méthode n'aurait pas pu être appliquée car le choc électrique aurait été présenté à moins de 30s entre la présentation des deux odeurs. Or cet intervalle de temps n'est pas suffisant pour que les mouches ne fassent pas d'association entre les stimuli (Tanimoto *et al.* 2004). Pour standardiser ces deux protocoles contrôles, nous avons donc choisi de présenter les chocs électriques au début de l'essai de pseudo-conditionnement, à 2 min de la première odeur pour limiter le fait que celle-ci devienne un signal de sécurité pour les mouches (Tanimoto *et al.* 2004).⁴¹

⁴¹ Il faut noter ici que dans le cas du pseudo-conditionnement massé, le choc électrique de l'essai suivant intervient 45 s après l'émission de la seconde odeur, et donc qu'il est encore possible que la mouche associe la seconde odeur avec le choc électrique.

Voici donc la description d'un essai de pseudo-conditionnement :

1. de 1min 30s à 2min 30s : émission d'air et émission des 12 chocs électriques, selon le même schéma que précédemment.
2. de 2min 30s à 4min 30s : émission d'air
3. de 4min 30s à 5min 30s : émission de la première odeur
4. de 5min 30s à 6min 15s : émission d'air pour éliminer la première odeur
5. de 6min 15s à 7min 15s : émission de la seconde odeur
6. de 7min 15s à 8min : émission d'air, pour éliminer la seconde odeur

Lorsque le conditionnement est terminé, les mouches sont ôtées du barillet à l'aide d'un réceptacle adapté, et sont transférées dans des bouteilles de milieu frais.

3.4.2 Phase de test

a) Conservation des mouches après conditionnement

La conservation des mouches entre la phase de conditionnement et la phase de test se fait à 18°C, dans une étuve sans odeurs d'élevage. Les scores de mémoire sont a priori meilleurs que lorsque la conservation se fait à 25°C. On ne sait pas si la température agit directement sur l'efficacité de la consolidation, mais à 18°C les mouches sont plus calmes et dépensent moins d'énergie, et les mouches ne doivent pas être stressées après conditionnement.

Les mouches sont remises dans la salle d'expérimentation à 25°C et 80% d'humidité une heure avant le début du test pour qu'elles s'habituent aux conditions expérimentales et qu'elles retrouvent un niveau d'activité locomotrice satisfaisant pour exprimer la réponse comportementale. Pour les tests de mémoire à court terme, réalisés 1 à 2 h après conditionnement, les mouches sont conservées dans la salle d'expérimentation. En général, la MLT et la MRA sont testées 24 h environ après conditionnement.

b) Conditions expérimentales du test

Les odeurs OCT et MCH sont utilisées aux mêmes concentrations que pour le conditionnement. Pour aller plus vite, deux appareils de test peuvent être utilisés en même temps. Les deux demi-lots de mouches conditionnées dans les expériences inverses sont testés directement l'un après l'autre dans le même appareil de test.

Les mouches sont introduites dans le tube de l'étage supérieur de la machine en les transvasant à l'aide d'un entonnoir, puis il faut tapoter l'appareil de test sur la moquette de la table pour les faire tomber dans la logette, et descendre aussitôt l'ascenseur à mi-étage pour

qu'elles ne s'échappent pas. Le test consiste à laisser les mouches se répartir dans les deux tubes pendant 1 min en fonction de leur choix. A la fin du test, l'expérimentateur remonte l'ascenseur et compte le nombre de mouches présentes dans chaque tube. Les mouches restant dans la logette ne sont pas prises en compte dans le calcul de la performance de mémoire.

3.4.3 Mesure de la performance de mémoire

La performance de mémoire s'évalue par un indice de performance (IP), défini par le nombre de mouches présentes dans les odeurs non-conditionnée et conditionnée, moyenné sur les deux expériences inverses. Pour chaque demi-lot de mouches des expériences inverses, on peut donc calculer un score tel que:

$$\text{ip} = \frac{\text{odeur non-conditionnée} - \text{odeur conditionnée}}{\text{odeur non-conditionnée} + \text{odeur conditionnée}} \times 100$$

Puis ces indices sont moyennés pour définir le score global du lot :

$$\text{IP} = \frac{\text{ip OCT} + \text{ip MCH}}{2}$$

Le score final s'évalue sur une échelle de -100 à 100. Les mouches naïves qui ne subissent pas le conditionnement présentent un IP proche de 0, car elles se localisent aléatoirement dans les deux odeurs. Plus l'IP est élevé, plus il indique une bonne mémoire de l'association odeur-choc électrique.

Certains paramètres du protocole de test ont été modifiés pour les adapter à l'observation de la réponse conditionnée individuelles et à la comparaison des tests en individuel et en groupe. Ces modifications sont décrites dans la partie « Mise au point » des résultats du projet n°3.

IV. OLFACTOMETRE A 4 VOIES POUR TESTER LA MEMOIRE OLFACTIVE (PROJETS N° 1, 2 ET 3)

4.1 Objectifs et avantages de l'utilisation de l'olfactomètre à 4 voies

L'olfactomètre à 4 voies (Fig. 14) est un dispositif expérimental qui a été développé initialement pour tester les réponses olfactives de petits insectes comme les pucerons (Petersson 1970) et les parasitoïdes (Vet *et al.* 1983).

Un des objectifs de Laure Kaiser dans le laboratoire de Thomas Preat, lié à mon projet de thèse, était d'adapter l'utilisation de l'olfactomètre à 4 voies au modèle drosophile, en se

basant sur son expérience du dispositif chez les parasitoïdes (De Jong et Kaiser 1991; Kaiser et De Jong 1995; Couty *et al.* 1999). Le but de cette démarche était d'appliquer cet appareillage aux deux paradigmes d'apprentissages olfactifs appétitif et aversif.

L'olfactomètre à 4 voies a des avantages par rapport à l'appareil de test en T, même dans le cas de tests de la préférence entre deux odeurs: comme il n'y a pas de barrière entre les flux, les mouches ne sont pas entravées dans leurs explorations et cela induit une diminution de la part aléatoire de leur réponse. De plus, le plan horizontal de l'olfactomètre permettrait de filmer le test, de suivre le trajet exploratoire des mouches et de faire un comptage automatisé du nombre d'individus dans les différentes zones de l'olfactomètre (par un logiciel d'analyse d'image) pour réduire le temps nécessaire à l'analyse des performances. Par contre le changement de contexte entre le conditionnement réalisé en barillet (donc dans des tubes ressemblant aux tubes de test de l'appareil en T) et le test en olfactomètre pourrait être un inconvénient potentiel. Pour valider l'utilisation de l'olfactomètre, Laure Kaiser et moi-même avons réalisé un certain nombre d'expériences visant à mettre au point le test de l'attractivité et de l'évitement olfactif dans l'olfactomètre à 4 voies et à comparer le niveau des réponses avec l'appareil de test en T. Certaines sont présentées dans le projet n°2, dans la partie « Phase de mise au point ».

4.2 Paramètres du test en olfactomètre (Fig. 14)

La pièce expérimentale est thermo- et hygro-régulée à 25 °C et 80 % d'humidité relative. L'olfactomètre est posé sur une table dont le plateau en plexiglas laisse passer de la lumière sur la surface de l'olfactomètre. La lumière est une lumière blanche triphasée de 800 lux provenant d'une table lumineuse. Un plastique noir et opaque a été rajouté sur le reste de la surface de la table de l'olfactomètre, pour éviter d'éclairer la pièce et ainsi éviter les biais et les potentiels repères spatiaux liés à la pièce. Pour la même raison, une « cheminée » (cylindre creux) opaque d'un mètre de haut a été rajoutée autour de l'olfactomètre lors des tests.

Il a été nécessaire de mettre en place une évacuation du flux d'air sortant de l'olfactomètre, de la pièce expérimentale vers l'extérieur du bâtiment. Nous avons fait des premiers essais infructueux avec une arrivée d'air pur comprimé (le même que celui utilisé dans le projet ECP). Dans le paradigme de conditionnement aversif du laboratoire il avait été observé que les performances comportementales des drosophiles étaient amoindries par les dépressions d'air engendrées par l'influx d'air comprimé dans l'appareil de test en T. Nous avons donc utilisé uniquement un système d'aspiration avec pompe à vide en aval de l'olfactomètre. Le flux d'air aspiré au centre de l'olfactomètre était de 0.8 l/min (soit 200 ml/min à chaque voie).

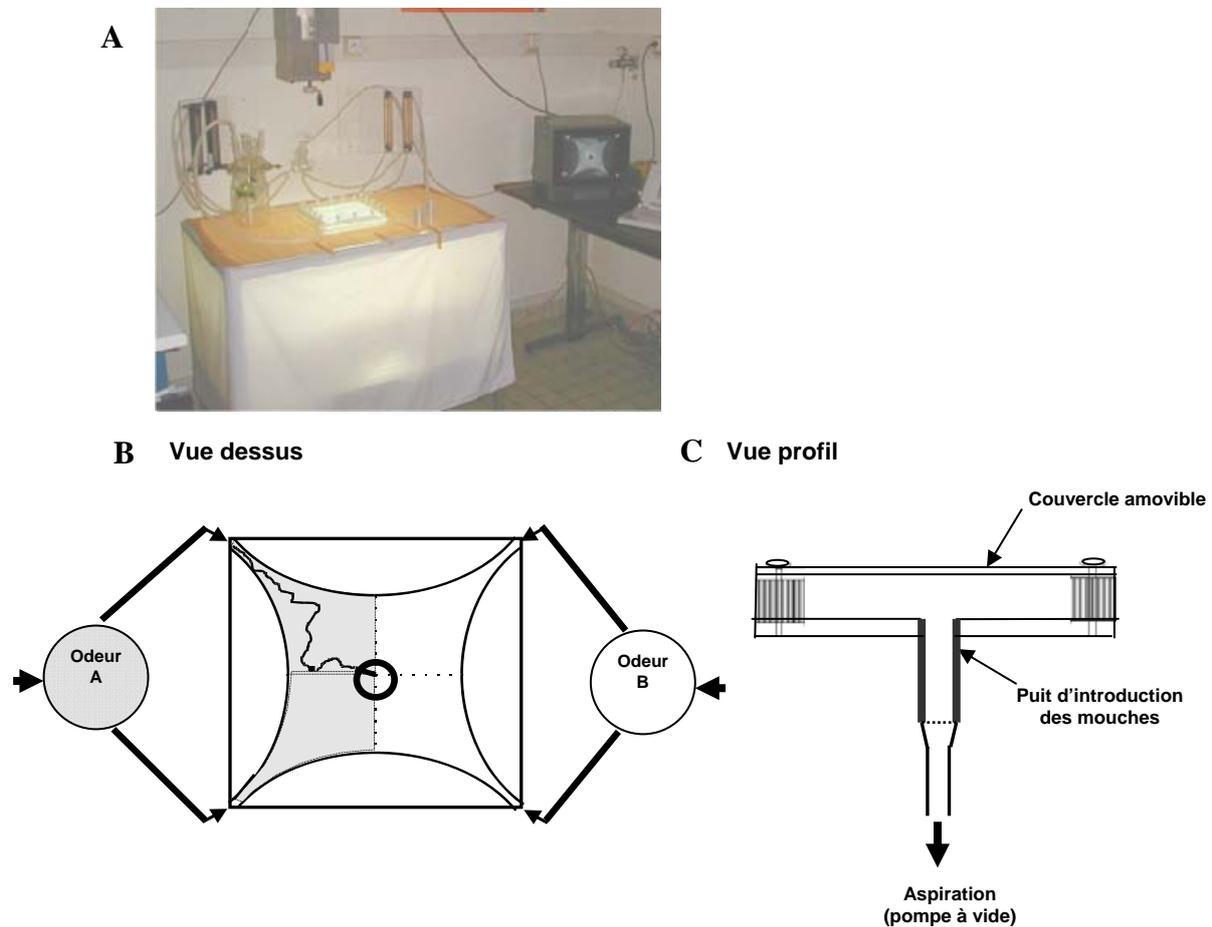


Figure 14: Dispositif de l'olfactomètre à 4 voies. **A.** Photo de la pièce expérimentale de l'olfactomètre à 4 voies, avec la table dont le plateau en plexiglas laisse passer la lumière par en-dessous à l'endroit de l'olfactomètre. Une caméra placée au dessus de l'olfactomètre filme le test, qui peut être visionné également en direct sur un écran de télévision dans la pièce expérimentale. **B.** Schéma de l'olfactomètre à 4 voies vu de dessus lorsqu'il est utilisé pour tester la préférence entre deux odeurs. Deux olfactomètres ont été utilisés durant la thèse, le premier d'environ 11 cm de côté intérieur (Figs. 20, 21) et le second plus petit de 9,5 cm (Tableau 1). Les 4 zones se distinguent sur le schéma par les pointillés (qui n'existent pas sur l'olfactomètre en lui-même). Comme indiqué par les flèches, chaque odeur arrive par deux voies et se diffuse dans la moitié de l'olfactomètre par aspiration au centre. Les flux se mélangent au niveau de la ligne médiane et au centre. Une mouche introduite au centre peut déjà faire le choix de sortir d'un côté ou l'autre en fonction de sa préférence olfactive, puis elle peut se diriger vers la source de l'odeur en remontant le flux, surtout si celle-ci est attractive (voir trajet symbolisé sur le schéma en exemple). **C.** Schéma de l'olfactomètre vu de profil, avec le puits d'introduction des mouches emboîté dans le trou au centre de l'olfactomètre, et connecté à une pompe à vide via un tuyau en téflon et une grande fiole vide pour éliminer les vibrations induites par la pompe.

Dans le cas des tests de l'*attraction* pour une odeur, nous avons déposé 6µl d'odeur non diluée soit dans un tube capillaire (vinaigre de cidre: fig. 21) soit sur un petit rectangle de papier canson (4x15 mm²; odeur de banane après conditionnement ECP: fig. 18A), le tout déposé dans une fiole raccordée à une seule voie de l'olfactomètre. Des fioles identiques vides étaient raccordées aux trois autres voies pour délivrer de l'air non-odorant.

Dans le cas des tests de *préférence* entre les deux odeurs OCT et MCH ou entre une des odeurs et de l'air seul (cas des tests discriminatifs appétitifs et aversifs présentés dans le projet n°2), les odeurs sont insufflées dans deux voies chacune (Fig. 14), diluées dans 160 ml d'huile de paraffine à différentes concentrations en fonction des expériences.

Au début du test, quand les mouches sont introduites au centre de l'olfactomètre, zone de mélange des flux, par le puits d'aspiration du flux d'air. Les mouches remontent le flux dans le puits par géotaxie puis on les laisse se répartir 1 à 3 min en fonction des expériences. Le choix pour un flux est mesuré:

- soit par un score de durée dans certains tests individuels (Fig. 21), calculé pour chaque mouche par le temps passé dans la zone de ce flux – le temps passé dans les autres zones, divisé par le temps total passé dans les 4 zones de l'olfactomètre,

- soit par un score de position dans un test individuel (Fig. 18A) et dans les tests en groupe (Fig. 20 et tableau 1), calculé à la fin du test par le nombre de mouches présentes dans ce flux – le nombre présentes dans les autres zones, divisé par le nombre total de mouches dans les 4 zones de l'olfactomètre.

V. ANALYSES STATISTIQUES GENERALES

Le test chi-square (χ^2) a été utilisé pour comparer des pourcentages de mouches ou de réponses entre des lots indépendants, en utilisant la correction de Haber pour les situations à 1 dll (χ^2_{Haber}).

Le test de Student (t) a été utilisé pour comparer les scores moyens de deux lots de mouches indépendants ou une moyenne et un score théorique de 0, ou encore deux lots dépendants (t_{paired}).

Pour comparer plus de deux moyennes entre elles, nous avons utilisé l'ANOVA à un facteur ou l'ANOVA à deux facteurs lorsque ces moyennes pouvaient être classées par facteur (exemple dans le projet n°3: performances de mémoires obtenues pour différents types de conditionnement et à des délais différents après le conditionnement). L'ANOVA à deux facteurs inclut alors le calcul de l'interaction entre les facteurs considérés, réalisé par la procédure GLM du logiciel « R » (sous *Linux*).

Nous avons utilisé le test de la médiane (avec l'approximation normale z) pour tester la symétrie des données autour de la médiane au sein d'un même lot de mouches.

Le test de Cochran (Q) a été utilisé pour comparer le pourcentage de réponses proboscitaires entre des essais successifs pour un même lot de mouches. Il est applicable seulement si $a \geq 4$ et $ab \geq 24$, avec a =nombre d'essais et b =nombre de mouches testées (les mouches qui ne font jamais ou constamment des réponses sont éliminées dans ce test statistique).

Lorsque l'analyse du test de Cochran révèle une hétérogénéité globale au sein des essais, il est complété par le test de Marascuilo et McSweeney pour les comparaisons multiples entre les essais. Il a également été possible d'utiliser le test de Mc Nemar (avec la déviation normale Z) pour comparer seulement deux essais pour un même lot de mouches, en ne passant pas par le test de Cochran.

Les tests non-paramétriques de Wilcoxon-Mann-Whitney (avec l'approximation normale z) et de Kruskal-Wallis (H) ont été utilisés pour comparer des moyennes entre respectivement deux ou plusieurs lots de mouches de faible effectif.

Pour l'ensemble des tests statistiques, nous avons utilisé le niveau de signification $\alpha=0.05$ dans les tests à hypothèse alternative bilatérale et 0.10 dans les tests unilatéraux. Nous avons également appliqué la correction de Dunn-Sidak lorsqu'un échantillon de données était utilisé dans une comparaison multiple, en diminuant le niveau de signification α en α' tel que $\alpha'=1-(1-\alpha)^{1/k}$, avec k =nombre de comparaisons réalisées sur le même échantillon de données. Avec $\alpha=0.05$ et $k=2$ par exemple, $\alpha'=0.025$ (Zar 1999).

Nous avons suivi les conditions d'application de Zar (1999) pour l'ensemble des tests, qui ont été réalisés ou vérifiés avec le logiciel de statistique StatXact6 (sauf pour le calcul de l'interaction dans les ANOVA à deux facteurs).

RESULTATS

PROJET N° 1

CONDITIONNEMENT APPETITIF DE L'EXTENSION DU PROBOSCIS CHEZ LA DROSOPHILE



CONDITIONNEMENT APPETITIF DE L'EXTENSION DU PROBOSCIS CHEZ LA DROSOPHILE

I. RESUME DE L'ETUDE

L'objectif du projet était de mettre au point le conditionnement appétitif de l'extension du proboscis (ECP) chez la drosophile. C'est un conditionnement de type pavlovien: une drosophile en contention doit apprendre à étendre le proboscis en réponse à un stimulus conditionnel olfactif (SC), en l'associant au préalable à un stimulus inconditionnel gustatif (SI) qui induit le réflexe de l'extension du proboscis (Réponse Inconditionnelle, RI) et que l'on récompense en permettant l'absorption de la nourriture. La réponse à l'odeur est alors une réponse conditionnée (RC), théoriquement similaire à la RI (Campan et Scapini 2002).

Durant mon stage de DEA, nous nous sommes basés sur le protocole de conditionnement classique de l'ECP couramment employé chez l'abeille (Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 1995), et nous avons modifié certains paramètres pour les adapter à la drosophile. Une odeur de banane a été utilisée comme SC et une solution de saccharose comme SI, à des concentrations choisies pour permettre de maintenir la drosophile en état de motivation alimentaire au cours du conditionnement et d'obtenir un maximum de réponses conditionnées. Les premières expériences réalisées au cours de mon DEA ont mis en évidence l'acquisition de réponses conditionnées au cours d'essais répétés. Malheureusement, les résultats n'ont pas été reproductibles dans l'état dans mon laboratoire de thèse⁴². Il a donc fallu passer par une nouvelle étape de mise au point, qui s'est révélée fructueuse essentiellement grâce à l'établissement d'une échelle d'extension du proboscis, permettant d'améliorer la caractérisation de la réponse conditionnée. Nous avons également testé les performances d'autres souches de drosophiles *CS*, cherché à améliorer le protocole de conditionnement espacé et à développer d'autres types de conditionnement et de test, ainsi qu'à améliorer les conditions d'expérimentation des mouches, en remplaçant par exemple le jeûne, engendrant trop de mortalité 24 h après le conditionnement, par une diète au tréhalose permettant d'affamer les mouches tout en les maintenant en vie pendant un minimum de 48 h.

Le protocole de conditionnement espacé a été alors ré-appliqué en comparant les effets du jeûne et de la diète. Il nous a permis:

- de vérifier la nature associative du conditionnement olfactif dans le cas du jeûne et de la diète, par la comparaison avec des lots contrôles pseudo-conditionnés.

⁴² Voir la partie « mise au point » de ce projet.

- de mettre en évidence la cinétique de l'apprentissage: le maximum de probabilité de réponse est obtenu dès un seul essai de conditionnement et reste stable aux essais suivants dans le cas du jeûne; elle atteint son maximum moins rapidement dans le cas de la diète et diminue ensuite. Nous avons vérifié que cette différence entre le jeûne et la diète était liée à une moins bonne motivation alimentaire dans le cas de la diète, non décelable au niveau du réflexe proboscidien (stimulation du proboscis avec le sucre), mais décelable au niveau du réflexe tarsal (stimulation des tarses avec le sucre).

- de caractériser la réponse conditionnée (RC): la probabilité d'apparition d'une RC au niveau du groupe et au niveau de l'individu est plus élevée que pour le lot contrôle; la RC se caractérise par des mouvements du proboscis de plus faible amplitude que la RI et l'amplitude des mouvements n'est pas augmentée par le conditionnement.

- de tester la mémoire à court terme: la mouche a une mémoire à court terme d'au moins 15 min dans le cas du jeûne. Mais il n'a été possible de mettre en évidence de la mémoire à 1h ni pour le jeûne ni pour la diète.

En parallèle, nous avons vérifié la capacité de la drosophile à répondre par l'activité du proboscis à une odeur appétitive (le vinaigre de cidre) et nous avons trouvé que la réponse conditionnée à l'odeur de banane était similaire à cette réponse inconditionnée à l'odeur de vinaigre.

Ces résultats font l'objet d'une publication dans « *Journal of Comparative Physiology A* » (Chabaud *et al.* 2006). Nous sommes persuadé que ce protocole peut être encore amélioré. A terme, il permettra d'enrichir les résultats obtenus avec le conditionnement olfactif aversif et peut-être d'appliquer chez la drosophile les techniques de neurosciences déjà permises par l'ECP chez l'abeille, qui nécessitent de maintenir l'individu en contention. Ainsi l'imagerie calcique, associée à la manipulation de l'expression de gènes de mémoire chez la drosophile, permettrait des avancées très significatives dans l'élucidation des processus mnésiques.

II. PHASE DE MISE AU POINT

Les expériences réalisées lors de mon stage de DEA au *Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés* (LNCI, Bures sur-Yvette) avaient démontré que les mouches étaient capables d'anticiper la récompense alimentaire par une extension plus ou moins complète du proboscis à la seule présentation de l'odeur conditionnée. C'était un apprentissage associatif (par comparaison avec des mouches contrôles) qui permettait de multiplier par deux ou trois les réponses à l'odeur dès le premier essai de conditionnement. Nous avons obtenu également des résultats encourageants pour la MCT à 1 h et la MLT à 24 h.

Cependant les premières expériences réalisées au début de la thèse au DEPSN ont été un échec, laissant supposer que les résultats très encourageants obtenus lors de mon stage de DEA au laboratoire LNCI n'étaient plus reproductibles. Nous avons donc recherché les causes de cette non-reproductibilité et les solutions pour remanier le protocole d'ECP.

Un des points importants est que le comportement des mouches en contention avait changé, avec une activité spontanée du proboscis plus importante en quantité (Fig. 15) et en amplitude par rapport au DEA, empêchant de distinguer les réponses potentielles à l'odeur. La mortalité entre le conditionnement (à 24 h de jeûne) et le test à 24 h (48 h de jeûne) avait considérablement augmenté, passant de 37% en DEA à 90% en début de thèse. Les mouches semblaient donc plus fragiles et plus stressées, et nous avons recherché les facteurs potentiels, en les modifiant quand cela était possible.

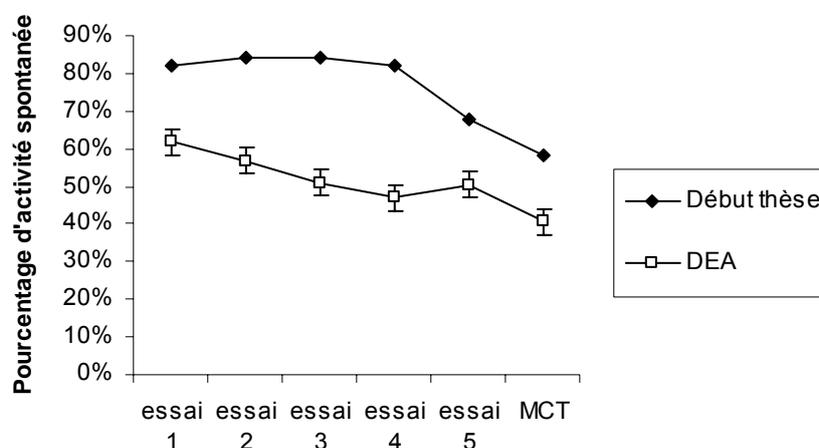


Figure 15: Pourcentage d'activité spontanée du proboscis plus élevé en début de thèse qu'en DEA. Le graphique représente le pourcentage de mouches montrant une activité spontanée du proboscis durant les 15 s précédant les essais de conditionnement et le test de MCT, pour des mouches à jeun conditionnées et pseudo-conditionnées en protocole espacé d'ECP, dans le cas d'une expérience de début de thèse (1 lot conditionné, N=50) et des expériences de DEA (moyenne calculée sur 2 lots de mouches conditionnés et 2 lots de mouches pseudo-conditionnés, N=49, 62, 50 et 62).

2.1 Différences non quantifiées liées au mode d'élevage ou au dispositif ouvert

Ces différences entre les deux sites expérimentaux concernaient l'élevage (absence de la photopériode, odeurs liées à la densité d'élevage) et le plus petit volume de la pièce expérimentale, pour lequel le dispositif ouvert était moins adapté (possibilité d'une évacuation imparfaite du stimulus odorant et recyclage trop rapide de l'air, à l'origine d'une instabilité de l'humidité relative de la pièce. Le mieux aurait sans-doute été de revoir

l'ensemble du système d'apport et d'extraction du flux d'air en un système fermé, mais la mise au point aurait été trop longue.

2.2 Causes de l'activité spontanée du proboscis

Nous avons testé deux hypothèses:

2.2.1 Hypothèse de l'excitation nerveuse centrale ou de la soif

L'état d'« excitation nerveuse centrale », induite après une stimulation sucrée, se définit par une augmentation de la probabilité de réponse d'extension du proboscis à une stimulation par de l'eau (Dethier *et al.* 1965; Vargo et Hirsch 1982). Cet état peut être diminué par l'absorption d'eau ou d'une solution salée de NaCl (Nelson 1971; Vargo et Hirsch 1982). Nous avons fait des essais avec présentation d'un papier imbibé d'eau avant le 1^{er} essai de conditionnement, puis à chaque observation d'une extension spontanée. La plupart des individus répondaient à l'eau et l'absorbaient, mais cela ne diminuait pas leurs comportements d'extension spontanée (Données non montrées). L'excitation nerveuse centrale et la soif n'étaient donc pas les principaux facteurs des extensions spontanées.

2.2.2 Hypothèse du stress de la contention

Nous avons observé de profils à la loupe binoculaire l'activité spontanée du proboscis de mouches naïves mises à différents niveaux de contention et séquestration. Le nombre d'extensions spontanées du proboscis augmentait avec le niveau de mise en contention, avec 17 % d'extensions spontanées dans une situation de séquestration avec un espace très réduit pour la locomotion (espace de 1 à 2 mm pour avancer ou reculer dans la pointe d'un cône de propipette), 55 % lorsqu'elles étaient immobilisées (espace nul dans la pointe du cône), et 78 % dans la situation de contention utilisée pour le conditionnement ECP (Fig. 11). Cela suggérait que les extensions spontanées étaient inhérentes au fait de ne pas pouvoir se déplacer et d'être placées en contention.

Nous avons fait quelques tentatives infructueuses pour modifier la contention, par exemple en collant un bout de papier filtre sous la pointe du cône pour que la mouche puisse y poser ses deux pattes avant (maintien des extensions spontanées). Une contention par collage du thorax à une épingle (Vaysse et Medioni 1976; Medioni *et al.* 1978; DeJianne *et al.* 1985) n'aurait pas permis d'enlever les individus de la contention entre le conditionnement et tests à long terme, et n'était pas adaptée pour les perspectives d'imagerie *in vivo*.

2.3 Amélioration de l'état physique des mouches

2.3.1 Modification de la méthode d'induction de l'état de motivation alimentaire

Nous avons analysé la mortalité des mouches à jeun sur le coton imbibé d'eau de source, dans le but de déterminer la durée pendant laquelle les mouches semblaient encore en bonne condition physique. Déjà 10 % des mouches mourraient entre 24 et 34 h de jeûne, puis le taux de mortalité augmentait de manière exponentielle à partir de 39 h, avec 95% de mortalité au bout de 48 h (N=42; pas de figure).

Dans le but de tester la mémoire à long terme ultérieurement, nous avons testé une méthode de nourrissage après 24 h de jeûne: 2 h après leur avoir donné du saccharose à 0.5M pendant 30 s (temps et quantité de sucre similaire à ce qu'elles prennent durant le conditionnement), les mouches ont été placées individuellement sur du milieu standard pendant 0, 30, 60 ou 90 min. Les résultats n'ont pas été concluants, car il n'y avait pas de différence de mortalité entre les différentes durées de nourrissage, avec environ 60 % de mortalité à 50 h dans les 4 cas (Pas de figure; Ns=11 individus).

Puis nous avons mis au point une diète sur saccharose à 0.015M, permettant une meilleure condition physique au moins jusqu'à 48 h. Il avait déjà été démontré que cette diète suffisait à des femelles pour survivre durant au moins 72 h, et que leur motivation alimentaire pour une solution de saccharose à 0.5M restait significative (Edgecomb *et al.* 1994). Nous avons comparé les performances d'apprentissage et de MCT entre des mouches à jeun (eau) et en diète (solution de saccharose 0.015M) pendant 24 h (Fig. 16A). Ces traitements ont été appliqués sur de l'agar, susceptible d'assurer un approvisionnement constant en eau, complémenté en nipagine pour limiter le développement des moisissures (agar 1%, nipagine 0.4%, eau). Mais les résultats n'étaient pas concluants, les performances obtenues avec la diète n'étant pas meilleures que celles obtenues avec le jeûne.

2.3.2 Différentes souches de *Canton-Spécial* (CS)

Au début de ma thèse, nous avons utilisé la souche utilisée couramment au laboratoire (nommée ici CS Gif). Celle du DEA provenait d'un mélange entre deux souches sauvages, les souches CS K et CS G (voir matériels et méthodes généraux) que le laboratoire avait utilisé ponctuellement. Il était donc possible que les capacités d'apprentissage en ECP diffèrent sous l'effet de la dérive génétique. Nous avons comparé les capacités d'apprentissage et de MCT en ECP de ces différentes souches, pour des mouches à jeun depuis 24 h sur milieu d'agar (Fig. 16B). Pour la suite du projet, nous avons utilisé la souche CS G qui semblait montrer de meilleures performances.

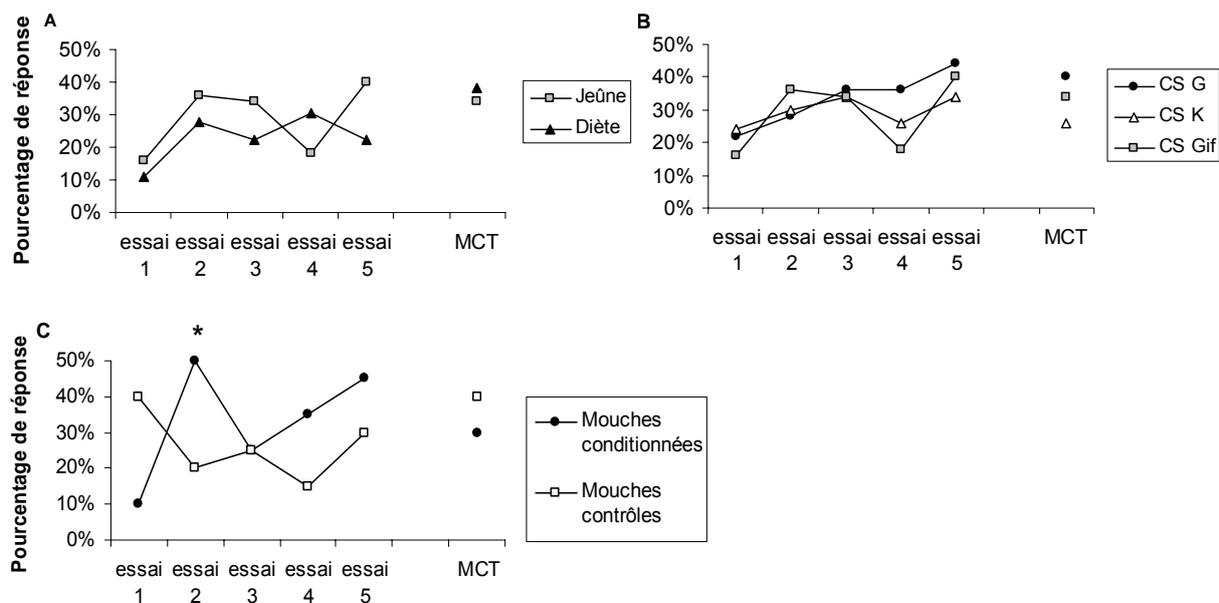


Figure 16: Performances d'apprentissage et de MCT de drosophiles CS après application du protocole de conditionnement espacé de l'ECP. A. Performances de la souche CS gif après mise à jeun sur agar (agar 1%, nipagine, eau; N=50) ou en diète sur agarose (agar 1%, nipagine, solution de saccharose 0.015M; N=36 pour le conditionnement et 21 pour le test). **B.** Performances de différentes souches de drosophiles CS (CS K du laboratoire de Kyung-An Han, CS G du laboratoire de Cahir O'Kane et CS Gif du laboratoire de T. Preat; Ns=50 individus) à jeun depuis 24 h sur milieu d'agar. Les données de la souche CS Gif sont reprises de l'expérience précédente (A). **C.** Performances d'individus conditionnés et contrôles pseudo-conditionnés, en diète depuis 24-26 h sur du coton imbibé d'une solution de tréhalose 0.015M (souche CS G; Ns=20). L'activité spontanée du proboscis prise en compte dans l'analyse est observée pendant les 15 s précédant l'odeur. Les étoiles représentent une différence significative avec une probabilité de *0.05, **0.01 et ***0.001.

2.3.3 Analyse de la mortalité en fonction des milieux de jeûne, de diète et des souches CS

Tout d'abord, nous avons trouvé que le jeûne sur coton permettait de garder en vie les mouches CS gif un peu plus longtemps que sur l'agar, que nous avons abandonné (Pas de figure; taux de mortalité à 48 h = 66% sur coton et 86% sur agar, N=35 et 51).

Nous avons ensuite cherché pour la souche CS G une diète différente du saccharose pour que le sucre de diète soit différent du sucre du SI (Fig. 17). Le tréhalose à 0.015M permettait une bonne survie jusqu'à 48 h (mortalité < 10 %). Une gamme de dilution de la solution de tréhalose nous a permis d'observer qu'au-delà de 0.03M, les mouches étaient maintenues en vie jusqu'à au moins 7 jours. Cette concentration risquait de diminuer la motivation alimentaire et nous avons choisi la diète tréhalose 0.015M pour la suite du projet.

Enfin, nous avons comparé le taux de mortalité des souches *CS Gif* et *CS G* avec la diète au tréhalose à 0.015M. La mortalité apparaissait plus rapidement pour la souche *CS Gif* (Pas de figure; 90% de mortalité à 4 et 5 jours respectivement), suggérant une dérive génétique entre ces souches de *CS* pour la résistance à l'inanition. Ceci a confirmé notre utilisation de la souche *CS G* pour la suite du projet n°1.

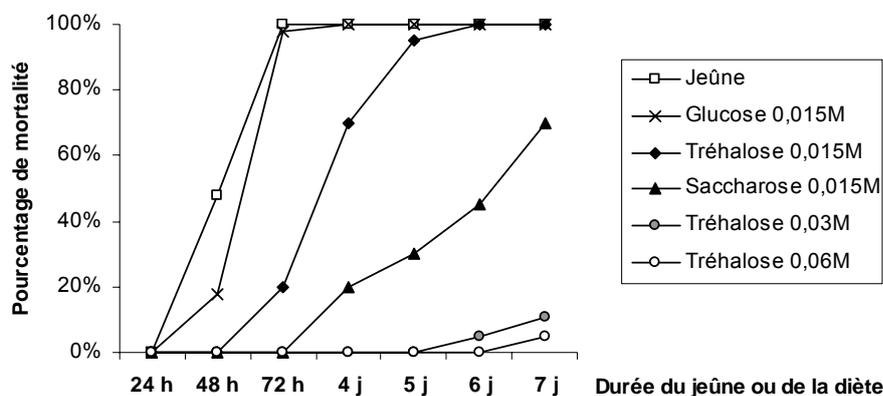


Figure 17: Analyse de la mortalité en fonction des milieux de jeûne et de diète. Les drosophiles de la souche *CS G* sont mises par groupe de 10 à jeun sur du coton imbibé d'eau minérale (N=100 individus) ou en diète sur du coton imbibé d'une solution de glucose 0.015M (N=100), de saccharose 0.015M (N=20), de tréhalose 0.015M (N=20), de tréhalose 0.03M (N=20) ou de tréhalose 0.06M (N= 20).

2.3.4 Effets des changements de souche et diète sur les performances d'ECP

Nous avons alors testé les capacités d'apprentissage et de MCT après une diète de 24-26 h (tréhalose 0.015M), en comparant les mouches conditionnées avec des mouches contrôles pseudo-conditionnées (Fig. 16C). Les performances du groupe conditionné étaient plutôt encourageantes. Malheureusement, le groupe contrôle avait un très fort niveau de base de réponses initiales et que l'on retrouve également au niveau du test de MCT. Les performances du groupe conditionné étaient significativement supérieures à celles du groupe contrôle seulement à l'essai 2, et donc on ne pouvait pas conclure qu'il s'agissait bien d'un apprentissage associatif.

2.4 Développement de différents types de conditionnement et de test

Nous avons ensuite tenté de développer différents types de conditionnement et de test pour augmenter les chances d'apprentissage associatif ou de visualisation d'une réponse conditionnée.

2.4.1 Conditionnement ECP et mesure de la réponse d'attraction en olfactomètre

Nous avons cherché si les mouches conditionnées à partir du paradigme d'ECP pouvaient répondre par une réponse d'attraction vers l'odeur de banane en olfactomètre. Les mouches ont été mises en diète 24 à 26 h, puis conditionnées en ECP avec le protocole espacé. Pour la moitié des mouches, nous avons réalisé un test d'ECP 1 h après la fin du conditionnement. Les autres mouches ont été testées en olfactomètre à 4 voies 1 h à 1h30 après la fin du conditionnement (Fig. 18A). Le test en olfactomètre ne fut pas très encourageant, avec seulement 27% des mouches dans l'odeur, contre 13, 17 et 43% pour les autres voies. Les mouches avaient du mal à remonter et à sortir de l'embout central sûrement par fatigue après le conditionnement en contention, et il y avait un biais vers un des côtés de l'olfactomètre à cause d'une déficience du matériel qui a été corrigée par la suite. Nous n'avons cependant pas retenté l'expérience.

2.4.2 Conditionnement ECP à double renforcement

Cette expérience consistait à faire deux essais d'apprentissage associatif très rapprochés, répétés 6 fois à des intervalles de 15 min. A chaque cycle, on présentait l'odeur seule (5 s), puis simultanément avec la récompense alimentaire (5 s), on attendait que les extensions du proboscis se calment (10 s) puis on représentait l'odeur seule (3 s) et l'odeur associée à la récompense (3 s). Nous n'avons analysé que les réponses faites au premier renforcement. Nous avons comparé les résultats avec ceux de mouches conditionnées avec le protocole espacé normal (protocole simple) pour des mouches à jeun depuis 24 h (Fig. 18B). La variabilité des réponses initiales entre les deux groupes n'a pas permis une interprétation nette des performances, mais les résultats du conditionnement à double renforcement étaient plutôt encourageants. Deux inconvénients majeurs de cette expérience est qu'elle était fastidieuse et qu'il n'était pas évident de trouver un bon protocole contrôle pour vérifier la nature associative de l'apprentissage.

2.4.3 Conditionnement ECP massé

Nous avons mis au point un conditionnement en 5 essais « massés », en gardant un intervalle de 5 min entre les essais successifs. Les mouches contrôles étaient « pseudo-conditionnées en arrière » (*backward conditioning*), c'est-à-dire en commençant par présenter le SI, puis l'odeur 30 s après. Un test de MCT était effectué 30 min après la fin du conditionnement. Ce conditionnement massé a été tenté sur des mouches à jeun (Fig. 18C) et en diète (Fig. 18D). Finalement, il paraissait moins performant que le conditionnement espacé, les mouches conditionnées montrant un score significativement supérieur à celui des mouches contrôles seulement dans le cas de la diète, à l'essai 4.

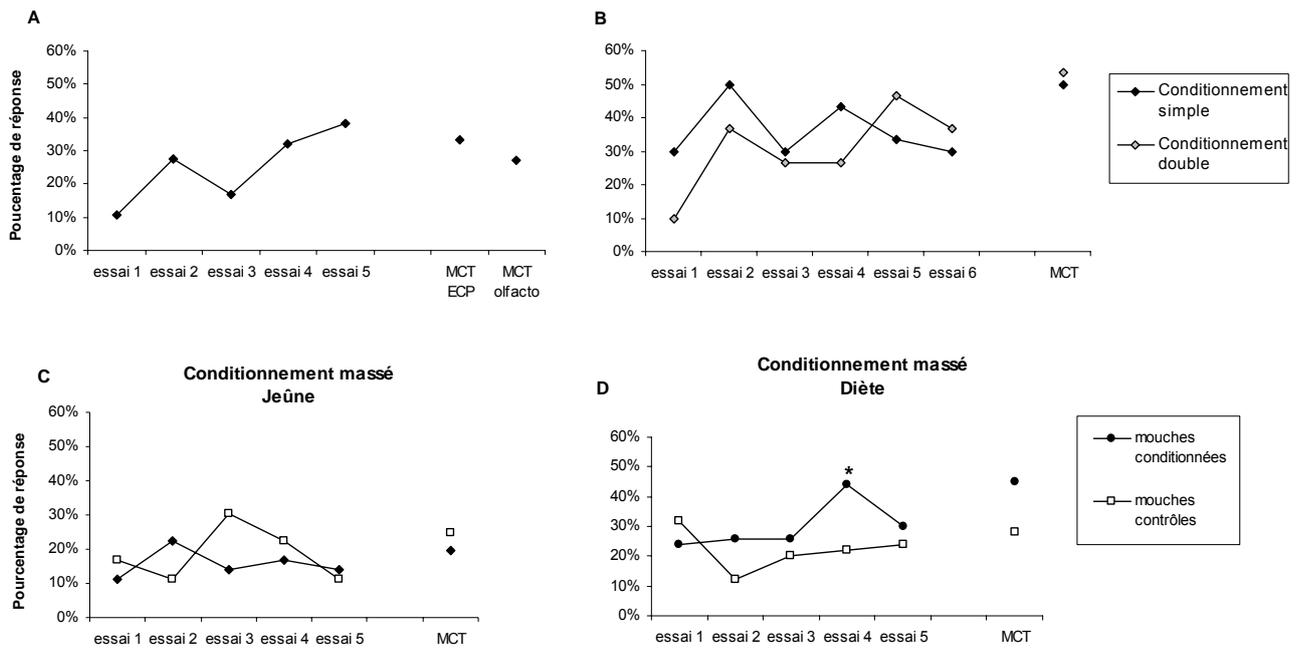


Figure 18: Essais de différents types de conditionnement et de test. **A.** Performance d'apprentissage en ECP (N=47) et test de la MCT en ECP (N=24) et pour la réponse d'attraction en olfactomètre 4 voies (N=23; une seule voie odorante contre 3). Les drosophiles (CS G) sont en diète tréhalose 0.015M depuis 24-26 h. **B.** Performances d'apprentissage et de MCT en ECP obtenues à partir d'un conditionnement espacé à double renforcement (N=30), et d'un conditionnement espacé simple (N=30). Les drosophiles (CS G) sont à jeun depuis 24 h. **C.** et **D.** Performances d'apprentissage et de MCT obtenues à partir d'un conditionnement massé, respectivement pour des mouches CS G à jeun (**C**, N=36) et en diète tréhalose 0.015M (**D**, N=50) depuis 24 h, comparées aux réponses d'un groupe contrôle, pseudo-conditionné en arrière (N=36 et 50) (Diète, Essai 4: $\chi^2_{\text{Haber}} = 4.5$, $P_{\text{unilatéral}} < 0.02$, 1 ddl). L'activité spontanée du proboscis est observée pendant les 15 s précédant l'odeur. Les différences significatives sont représentées par des étoiles, avec une probabilité de *0.05, **0.01 et ***0.001.

2.5 Standardisation du protocole et objectivité des observations: re-définition d'une réponse conditionnée

Finalement, l'étape la plus importante a été d'améliorer la standardisation du protocole et l'objectivité des observations, en passant par un travail à deux expérimentateurs et en aveugle, par l'établissement d'une échelle d'extension du proboscis, et par la redéfinition d'une réponse conditionnée:

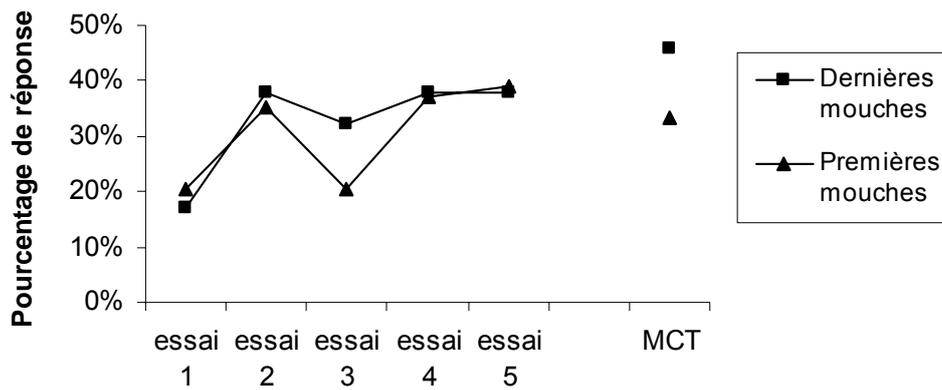


Figure 19: Performances des mouches en fonction de la durée restée en contention avant le conditionnement. Nous avons analysé les données des mouches CS G conditionnées avec le protocole espacé des expériences de la fig. 16B, C et de la fig. 18A, B. Le groupe des « premières mouches » correspond aux 5 premières mouches de chaque expérience, restées 30 à 45 min en contention avant expérimentation, et le groupe de « dernières mouches » correspond aux 5 dernières mouches de chaque expérience restées 15 à 30 min en contention avant expérimentation (Ns=53-54 pendant le conditionnement et 45-46 pour le test de MCT).

2.5.1 Standardisation du protocole et travail partiellement en aveugle

Avec un seul expérimentateur, les mouches attendaient entre 15 et 45 min en contention avant leur conditionnement. Nous avons observé sur les données obtenues jusque-là que les performances des premières mouches avaient tendance à être légèrement moins bonnes que celles des dernières (Fig. 19; différences non significatives). Le fait de travailler seul impliquait également de préparer à l'avance les 5 pipettes d'odeur utilisées pour les essais de conditionnement, ce qui pouvait induire une diminution de la concentration du SC au cours de l'expérience.

Les expériences de conditionnement ont été effectuées par deux expérimentateurs alternativement, Laure Kaiser et moi-même. Le premier expérimentateur effectuait le conditionnement, notait ses observations durant le conditionnement, et enregistrait une vidéo de la séquence expérimentale. Le second expérimentateur aidait le premier à mettre les mouches en contention pour standardiser à 15 min le temps passé en contention avant le conditionnement, puis en préparant les nouvelles pipettes d'odeur au fur et à mesure de l'expérience, pour obtenir un SC identique aux 5 essais du conditionnement. Ensuite, le premier expérimentateur vérifiait les notations où il avait eu des doutes durant l'expérience à l'aide de l'enregistrement vidéo, et le second vérifiait en aveugle les observations du premier. Cette manière de travailler nous a permis d'assurer la fiabilité des observations et de limiter l'effet potentiel de l'expérimentateur sur la notation des observations. Ce travail a également

été une étape déterminante pour la distinction fine de différentes catégories de mouvements du proboscis, qui a permis d'établir une échelle de l'extension du proboscis.

2.5.2 Etablissement d'une échelle de l'extension du proboscis

Une des principales difficultés rencontrées au début de ce projet a été de caractériser ce qu'on attendait d'une réponse du proboscis à l'odeur. En effet, les mouvements passent par un continuum de l'absence de mouvement jusqu'à la complète extension du proboscis, les mouvements intermédiaires n'étant pas toujours aisément interprétables. Nous avons alors établi une échelle classant les mouvements en niveaux d'extension, comprenant 6 niveaux distincts de l'extension (Fig. 1 art.1). Cette catégorisation est plus détaillée que l'échelle de Vaysse pour la drosophile (Vaysse 1982) et que celle de Dethier pour *Phormia regina* (Dethier *et al.* 1965), qui ne prennent pas en considération les plus petits mouvements du proboscis.

2.5.3 Re-définition de la réponse conditionnée

L'échelle d'extension du proboscis nous permettant de fiabiliser les observations des faibles niveaux d'extension, nous avons décidé de compter comme réponses à l'odeur l'ensemble des augmentations de l'activité du proboscis (par rapport à l'activité précédant l'odeur), de l'apparition du simple tremblement jusqu'à l'extension complète du proboscis. Un long travail de ré-analyse des données de DEA et de début de thèse a donc été réalisé, à l'aide des vidéos enregistrées depuis le début de la thèse et des descriptions assez précises notées au cours des expériences. Les données présentées dans cette partie de « mise au point » prennent en compte ces modifications.

L'activité spontanée que la mouche montrait durant les 15 s (surtout les 10 premières) précédant l'odeur nous empêchait de distinguer les réponses à l'odeur de l'activité spontanée. La plus forte activité des 10 premières secondes pouvaient provenir du changement de placement lors du passage de la position d'attente à la position de test dans le flux d'air sous la loupe binoculaire. Pour la suite des expériences, nous avons donc diminué de 15 s à 5 s le temps d'observation de l'activité spontanée précédant l'odeur, équilibrant en outre les périodes d'enregistrement de l'activité avant et durant la stimulation odorante (et ce également pour le test de mémoire).

A l'aide de l'échelle ordinale établie, nous avons également pu analyser l'amplitude des réponses, définie en accord avec Dethier *et al.* (1965) par la différence entre les niveaux d'extension avant et pendant l'odeur, et ainsi comparer la qualité des réponses conditionnées et des réponses obtenues pour les groupes contrôles.

L'ensemble de ces modifications ont permis ensuite d'obtenir des courbes d'apprentissage reproductibles et d'aller plus loin dans la caractérisation de la réponse conditionnée de l'activité du proboscis.

III. ARTICLE N°1: OLFACTORY CONDITIONING OF PROBOSCIS ACTIVITY IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

L'article n°1 qui suit, « **Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*** », a été publié en 2006 dans *Journal of Comparative Physiology A* 192: 1335-1348. Il prend en compte une partie des expériences de DEA ré-analysées, une partie des expériences de re-mise au point, et la suite des expériences réalisées durant la thèse.

**OLFACTORY CONDITIONING OF PROBOSCIS ACTIVITY IN *DROSOPHILA*
*MELANOGASTER***

**Marie-Ange CHABAUD^{1,2}, Jean-Marc DEVAUD³, Minh-Hà PHAM-DELÈGUE^{1,4},
Thomas PREAT^{2,5} and Laure KAISER^{1,2*}**

¹ *Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés - INRA - 91440 Bures-sur-Yvette (France).*

² *Développement, Évolution et Plasticité du Système Nerveux - CNRS - Bât. 32/33, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex (France).*

³ *Centre de Recherches sur la Cognition Animale - Université Paul Sabatier - CNRS UMR 5169 - Bât 4R3, 118 route de Narbonne, 31062, Toulouse Cedex 04 (France).*

⁴ *Present address : Direction des Relations Internationales - CNRS - 3 rue Michel Ange, 75016 Paris (France).*

⁵ *Present address : Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire - CNRS - ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris (France).*

* To whom correspondence should be addressed.

E-mail : kaiser@iaf.cnrs-gif.fr

Tel.: 33 (0)1 69 82 36 68

Fax.: 33 (0)1 69 82 34 47

Running title: Olfactory conditioning of proboscis activity.

Abbreviations **CS:** conditioned stimulus · **US:** unconditioned stimulus · **CR:** conditioned response · **UR:** unconditioned response · **WT:** wild-type · **SOG:** suboesophageal ganglion · Scale of proboscis movements: **N:** no movement, **T:** labellum trembling, **PL:** palp trembling and/or slight extension of the labellum, **E1:** extension of the labellum, **E2:** extension of the labellum and the haustellum, **E3:** complete extension, **Ns:** samples size.

Abstract Olfactory learning and memory processes in *Drosophila* have been well investigated with aversive conditioning, but appetitive conditioning has rarely been documented. Here, we report for the first time individual olfactory conditioning of proboscis activity in restrained *Drosophila melanogaster*. The protocol was adapted from those developed for proboscis extension conditioning in the honeybee *Apis mellifera*. After establishing a scale of small proboscis movements necessary to characterize responses to olfactory stimulation, we applied Pavlovian conditioning, with five trials consisting of paired presentation of a banana odour and a sucrose reward. *Drosophila* showed conditioned proboscis activity to the odour, with a two-fold increase of percentage of responses after the first trial. No change occurred in flies experiencing unpaired presentations of the stimuli, confirming an associative basis for this form of olfactory learning. The adenylyl cyclase mutant *rutabaga* did not exhibit learning in this paradigm. This protocol generated at least a short term memory of 15 min, but no significant associative memory was detected at 1 h. We also showed that learning performance was dependent on food motivation, by comparing flies subjected to different starvation regimes.

Key words Insect · Appetitive conditioning · Associative learning · Sugar reward · Starvation.

INTRODUCTION

In the fruit fly, olfaction is involved in many natural tasks of the behavioural repertoire, such as mating and searching for food, egg-laying sites or congeners. However, there have been few attempts to condition odour attraction and most olfactory learning paradigms condition odour avoidance. One such paradigm is the conditioned suppression of male courtship with virgin females after experiencing rejection from mated females (Ackerman and Siegel 1986; Ejima *et al.* 2005). A well known paradigm is the aversive conditioning of odour choice in a T-maze using odour as the conditioned stimulus (CS) and electric shock as the unconditioned stimulus (US) (Quinn *et al.* 1974; Tully et Quinn 1985). For the last 30 years, this robust associative conditioning has been the most widely used in *Drosophila melanogaster* (Preat 1999) to investigate molecular, cellular and genetic bases of odour learning and memory (for review, Davis 2005), with the description of distinct olfactory memory phases (Tully *et al.* 1994; Dudai *et al.* 1988; Isabel *et al.* 2004) and the characterisation of the involved brain structures (De Belle and Heisenberg 1994; Zars *et al.* 2000; Pascual and Preat 2001).

Some properties of learning and memory might however be partly specific to the paradigm used, and cannot yet be fully generalised. Flies therefore must be studied in several learning

situations to understand specific functions of genes and to compare learning and memory mechanisms in different motivational situations. Yet there are few studies in adult *Drosophila* comparing aversive conditioning with olfactory appetitive conditioning, which uses sugar as the US (Tempel *et al.* 1983; Heisenberg *et al.* 1985; Milosevic 1999; Schwaerzel *et al.* 2003). Among the learning mutants isolated in screens using the odour-shock conditioning, *rutabaga* has a learning deficit with the appetitive conditioning protocol whereas *dunce* has normal learning ability but rapidly forgets following training (Tempel *et al.* 1983; Schwaerzel *et al.* 2003). Tempel *et al.* (1983) also found differences in the memory span of WT strain between both paradigms, with a slower consolidation but more stable memory of odours associated with sugar reinforcement. More recent experiments revealed the requirement of distinct catecholamines in both associative pathways (Schwaerzel *et al.* 2003).

Calcium imaging was recently applied to visualize spatio-temporal patterns of neuronal activity during electric shock conditioning in restrained flies (Riemensperger *et al.* 2005). In order to achieve such an approach for appetitive olfactory learning, a conditioning paradigm on restrained flies is needed. In the honeybee, the robust olfactory conditioning of proboscis extension with sugar reward allows the observation of training and memory retrieval in restrained bees by optical imaging (Faber *et al.* 1999). Combined with pharmacological and electrophysiological investigations, this paradigm has provided increasingly detailed cellular and molecular information concerning the processes of olfactory learning and memory (Menzel 2001; Müller 2002).

Several experimental paradigms have shown that *Drosophila* can learn to extend or withdraw their proboscis through associative learning. One such paradigm is the conditioned inhibition of the proboscis extension reflex, using either low intensity electric shocks (Vaysse and Médioni 1976) or quinine solution (Médioni *et al.* 1978; DeJianne *et al.* 1985) as negative reinforcement. Excitatory conditioning has also been observed, using salt as CS and sugar as US (Holliday and Hirsch 1986; Fresquet 1999). Finally, non-associative conditioning protocols have been set up to habituate or sensitize the proboscis extension reflex (Duerr and Quinn 1982).

Olfactory excitatory conditioning has however not yet been investigated with success in individual restrained *Drosophila*. We developed this paradigm here because it has two significant benefits: first, it provides a second appetitive conditioning paradigm for *Drosophila*. This is important in determining the generality of mutations on learning or memory. Second, neural imaging studies that attempt to correlate neural activity with learning in *Drosophila* suffer from a lack of suitable conditioned behaviour. Thus, conditioning of a restrained fly, with measurable changes in behaviour, allows for the direct examination of neural processes involved in learning and memory.

We developed the classical odour conditioning of proboscis extension reflex, by associating a banana odour (CS) with sucrose (US) delivered to the proboscis of starved flies. This was done by adapting the protocol from the procedure commonly applied to study honeybee olfactory learning (e.g. Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 1995). We investigated the associative basis and other characteristics of the proboscis extension response to the banana odour and looked for short term memory. We also checked if our paradigm could detect a learning deficit in the mutant *rutabaga*. We tried to improve learning and memory performance with different starvation regimes. In comparison with the conditioned response (CR), we finally characterised responsiveness of naive flies to the US (unconditioned response, UR) and to an innately appetitive vinegar odour.

MATERIALS AND METHODS

Biological material

The subjects used were female adult *Drosophila melanogaster* from the WT strain Canton-S (from T. Preat's laboratory stock) and from the mutant strain *rutabaga* (*rut*²⁰⁸⁰). The stocks were reared at 18°C on standard *Drosophila* medium. Only females were used because males have a lower resistance to starvation and manipulation (Vaysse and Médioni 1973). For all experiments, newly emerged females were kept on fresh food (10 per vial) for 24 h at 25°C under 80% relative humidity, in a 12:12 h light:dark cycle. They were then starved for 24 h in a 25 ml glass vial containing a 0.6 g ball of cotton wool soaked with 5 ml of mineral water, except when we tested low-sugar diets, where the cotton wool was soaked with 5 ml of low concentrated sugar solution (15 mM). At the time of the experiment, females were 2 days-old, an age at which the olfactory pathway has matured (Devaud *et al.* 2003) and learning performance is good in the electric shock paradigm (Tully and Quinn 1985). In our experimental conditions, females were virgin, having been separated from males on the day of emergence, with the aim of homogenizing as much as possible the flies' experience. For all behavioural experiments, flies were trained between 10.00 AM and 18.00 PM.

Experimental device

Flies were individually mounted in 1 ml micropipette tips, following a procedure adapted from Vargo and Hirsch (1982), with the head and both front legs pushed out. A piece of cotton wool prevented the fly from going back inside the tip. The fly was positioned in a constant airflow of 140 ml/min delivered through a 1 cm diameter glass tube, placed 5 mm in front of the fly. This flow consisted of a main airflow (125 ml/min) and a secondary one (15 ml/min) used for the odour stimulation. The odorant solution (6 µl) was deposited onto a 4 x

15 mm piece of 200 g/m² paper, inserted in a disposable Pasteur pipette. The secondary flow was delivered continuously into the main airflow, either through the pipette containing the odorant paper or through a similar empty pipette. A solenoid low-latency valve was used to control odour delivery. With this device, the odour reached the fly in less than 1 second. An exhaust fan was placed downstream of the fly to extract released odours from experimental room. At the beginning of each trial, the fly was placed in the airflow for 15-20 s to allow familiarization with the training situation. Proboscis movements were observed at magnification x 20 on restrained flies in profile through a stereo microscope (Fig 1). The US was applied to the labellum with a filter paper tip. A new paper tip was used for each fly, and the Pasteur pipette with the odour source was changed at the beginning of each trial. Conditioning experiments were performed by two experimenters alternately. Live observations made by one experimenter were checked on video recordings by the other, who was blind to the experimental condition of the flies. This ensured that results were accurate and unbiased by live observation and avoided potential experimenter effect in the notation of observations.

Conditioning procedure

We chose a 0.5 M sucrose solution as the US, which provided a constant food motivation over 5 spaced successive trials in 24 h starved flies. This ensured that learning motivation was constant during the conditioning phase. The odorant used as CS was a banana odour, derived from a natural banana extract containing natural spice, specific chemical compounds of banana odour, and 33 % alcohol (Haarmann & Reimer ®, ref.209725). In the paired procedure, a trial consisted of CS delivery for 10 s; half-way through, the proboscis extension reflex (unconditioned response – UR) was elicited by contacting the labellum of the fly with the US; then UR was rewarded by sucrose uptake during the last 5 s of the CS delivery. Each trial was repeated 5 times, with a 15 min inter-trial-interval. As control we used an unpaired procedure, in which a trial consisted of US delivery 7.5 min after CS, *i.e.* midway between the CS of two consecutive trials. This group allowed us to control for possible non-associative effects due to odour or sugar stimulation. Memory test was performed 1 h after the last trial, by delivering the CS for 10 s. After the test, all flies were assayed for the proboscis extension reflex and for food intake by stimulating the labellum with the sucrose solution. In our conditioning paradigm, sucrose was always delivered to the proboscis and not to the front tarsi, for an immediate sucrose uptake. Note that in honeybees, US delivery to the proboscis only can act as a reinforcer, generating similar learning performance to that achieved by compound US delivery to the antennae and proboscis (Bitterman *et al.* 1983; Sandoz *et al.* 2002). To avoid the effect of possible visual conditioning (*i.e.*, perception of the sudden

approach of the tip loaded with sugar toward the proboscis), the tip was presented during odour stimulation also in the unpaired procedure and the memory test.

The procedures specific to each experiment are indicated within the Results section.

Data recording

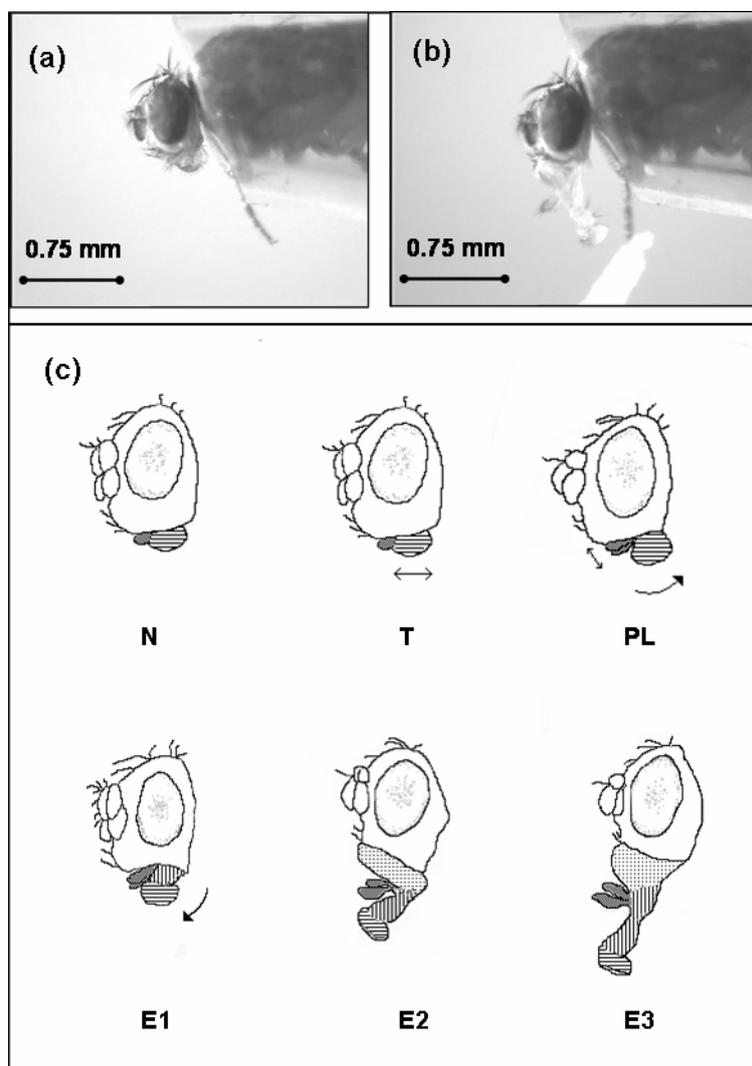


Figure 1: Observation of proboscis movements in *Drosophila*. a, b Observation of restrained *Drosophila* in micropipette tip, in profile through a stereo microscope (magnification x 20). Proboscis activity was characterised by levels of protrusion from no movement (a) to full proboscis extension (b), occurring for example when touching the tarsus with a filter paper tip imbued with 0.5 M sucrose. c Ordinal 6-point scale of proboscis protrusion, from no movement (N; 0 point), trembling of the labellum (T; 1 point), trembling of maxillary palps and/or slight extension of the labellum (PL; 2 points), slight extension of the haustellum (E1; 3 points), extension of the haustellum and partial extension of the rostrum (E2; 4 points), to full extension of the proboscis (E3; 5 points). Photos and schematic diagram were realized from a video recording of different restrained flies. Legend: maxillary palps (grey), labellum (horizontal hatchings), haustellum (vertical hatchings), rostrum (dots).

To characterize proboscis activity, we identified several levels of protrusion from no movement (Fig. 1a) to full proboscis extension (Fig. 1b), which defined an ordinal 6-point scale (Fig. 1c):

- 0: no movement of proboscis (N), which remains withdrawn in the proboscal cavity,
- 1: trembling of labellum (T), with proboscis withdrawn in the proboscal cavity,
- 2: trembling of maxillary palps and/or slight extension of labellum (PL), producing an angle between palps and labellum,
- 3: slight extension of haustellum (E1), producing an angle between labellum and head,
- 4: extension of haustellum and slight extension of rostrum (E2), with an acute angle between haustellum and rostrum,
- 5: full extension of haustellum and rostrum (E3), with a 180° angle between haustellum and rostrum.

This categorization is more detailed than Vaysse's scale for *Drosophila* (Vaysse 1982) and Dethier's scale for *Phormia regina* (Dethier *et al.* 1965), neither of which considers small proboscis movements.

During conditioning, some flies had their proboscis in a more or less protruded position at some trials. This corresponded to rostrum distension, which may be due to hemolymph pressure in the rostral cavity. These flies were not discarded because we could still see the movements of the 6-point scale and because they didn't have the proboscis protruded in all of the successive trials. In total, this behaviour was seen in 3-10 % of all trials in all experiments. Proboscis activity occurred spontaneously when flies were mounted in the micropipette tip. This activity formed a background noise, from which we had to isolate the proboscis response to odour stimulation. To do so, we compared proboscis activity observed during the first 5 s of the odour to spontaneous proboscis activity observed at least 5 s before the onset of the odour (15 s in the experiments of Figs. 2 and 3 then 5 s in the experiments of Fig 5, Tables 1 and 2, to equalize periods of activity recording). During both periods, since several movements could appear, we noted only the highest level of proboscis protrusion. We defined a response to the odour when proboscis protrusion was higher during the odour than before, according to the definition of the classical conditioning (Campan and Scapini 2002), where the CR elicited by the CS should be similar to the UR elicited by the US. Unchanged or lower activity was considered as no response.

Proboscis responsiveness was then analysed with three variables:

- the *percentage of responding flies* per trial and per group, to visualize the learning curves.

For flies responding at least once during the conditioning phase, we characterised their conditioned behaviour by:

- the *number of responses per individual*, to analyse individual learning performance.
- the *amplitude of response*, estimated like Dethier *et al.* (1965) by the difference between levels of protrusion before and during the odour presentation, quantified with the ordinal scale defined above. We thus determined if conditioned responses had significantly different amplitude from responses observed in the control group.

Statistical analyses

The chi-square test (χ^2) was used to compare for each trial the percentage of responses between independent groups. We applied the Haber correction for 1 df chi-square test (Zar 1999). When a given data sample was used in several comparisons, significance level was corrected with the Dunn-Sidak correction: $\alpha' = 1 - (1 - \alpha)^{1/k}$, with k = number of comparisons realized on a same data sample. With $\alpha = 0.05$ and $k = 2$ for example, $\alpha' = 0.025$ (Zar 1999). The Cochran test (Q) was used to compare the percentage of responses between successive repeated trials in a same group of flies. The McNemar test, which calculated the normal deviate Z , was applied when only two trials were compared in the same group (Zar 1999). When Cochran analysis showed a global heterogeneity among trials, it could be completed by the Marascuilo & McSweeney (S) test for multiple pairwise comparisons between trials. The non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney test was used (with the normal approximation z) to compare amplitudes of response between two groups, and the Kruskal-Wallis test (H) to compare more than two groups. Analyses were run or verified with the StactXact6 statistical software.

RESULTS

Associative learning of the WT strain and learning defect of the *rutabaga* strain.

The paired training procedure was applied to WT flies and compared with the unpaired procedure used as a control. We also applied the paired training procedure to the learning mutant *rut*²⁰⁸⁰ to reassess its poor learning performance in this paradigm (experiment 1). The experiment with WT flies was repeated to perform the 1 h-memory test (experiment 2). In both experiments, all flies were starved.

Learning curve

Learning curves of WT flies were similar in experiments 1 (Fig. 2) and 2 (Fig. 3). After the first trial, the WT-paired group showed a significant learning curve (Figs. 2a, 3a; $P < 0.001$; $Q > 24.48$; 4 df): the percentage of responses increased two-fold at trial 2, then remained at a mean plateau level of 62-71 % until trial 5. In contrast, flies trained with the unpaired procedure showed 33-34 % responses on average with no significant change during the

procedure (Figs. 2a, 3a; $P > 0.15$; $Q < 6.65$; 4 df). The percentage of responses became significantly higher in the paired group than in the unpaired group from trial 2 (Figs. 2a, 3a; $P < 0.01$; $\chi^2_{Haber} > 5.46$; 1 df). This result shows that responses of the paired group have been conditioned to banana odour.

Responses of *rutabaga* flies were not increased by the paired procedure and remained at 26 % on average (Fig. 2a; $P = 0.72$; $Q = 2.08$; 4 df). In addition, they were not statistically different from the unpaired group (Fig. 2a; $P > 0.05$; $\chi^2_{Haber} < 1.97$; 1 df). The *rutabaga* strain therefore showed no associative learning capacity with this analysis of the percentage of CR.

Spontaneous activity does not determine the percentage of conditioned response

Because we defined a response as being a level of proboscis movement during the odour stimulation that is higher than spontaneous movement before the odour, the probability that an individual would respond might depend on its spontaneous activity. In experiments 1 and 2, we can rule out the hypothesis that the spontaneous proboscis activity fully determines the probability of CR in the paired group, since the paired and the unpaired groups of the WT strain displayed similar spontaneous activities (Figs. 2b, 3b; $P > 0.14$; $z < 1.47$; 1 df), with a slight decrease from the first trial (T or PL movements) until the test (N or T movements).

For the *rutabaga* strain, the spontaneous activity was significantly higher than for the WT strain (Fig. 2b; $P < 0.04$; $H > 6.37$; 2 df) and did not decrease along the trials, with movements of PL type on average. Responses of the *rutabaga* strain were therefore more limited than the WT strain by the spontaneous activity of proboscis.

Individual learning performance

Similar results were observed in experiments 1 and 2. 94-98 % of the flies in the paired group and 74-76 % in the unpaired group responded at least once to the odour after trial 1. In the paired group, these flies exhibited a mean number of 2.9 ± 0.1 and 2.7 ± 0.1 CR during the conditioning, which was higher than 1.9 ± 0.2 and 1.8 ± 0.1 for the unpaired group (no Fig.; $P < 0.001$; $z > 3.91$; 1 df; samples size (Ns): see Figs. 2a and 3a). The probability of responding for an individual fly was therefore increased by the paired procedure, but the majority of flies (*i.e.* 65-79 %) did not respond in every trial. With the paired procedure, *rutabaga* flies did not increase their individual response probability, with 1.6 ± 0.1 CR per responding fly, which was not different from the unpaired group (no Fig.; $P = 0.10$; $z = 1.25$; 1 df; Ns: see Fig. 3a). There was therefore no evidence for individual learning in *rutabaga* flies.

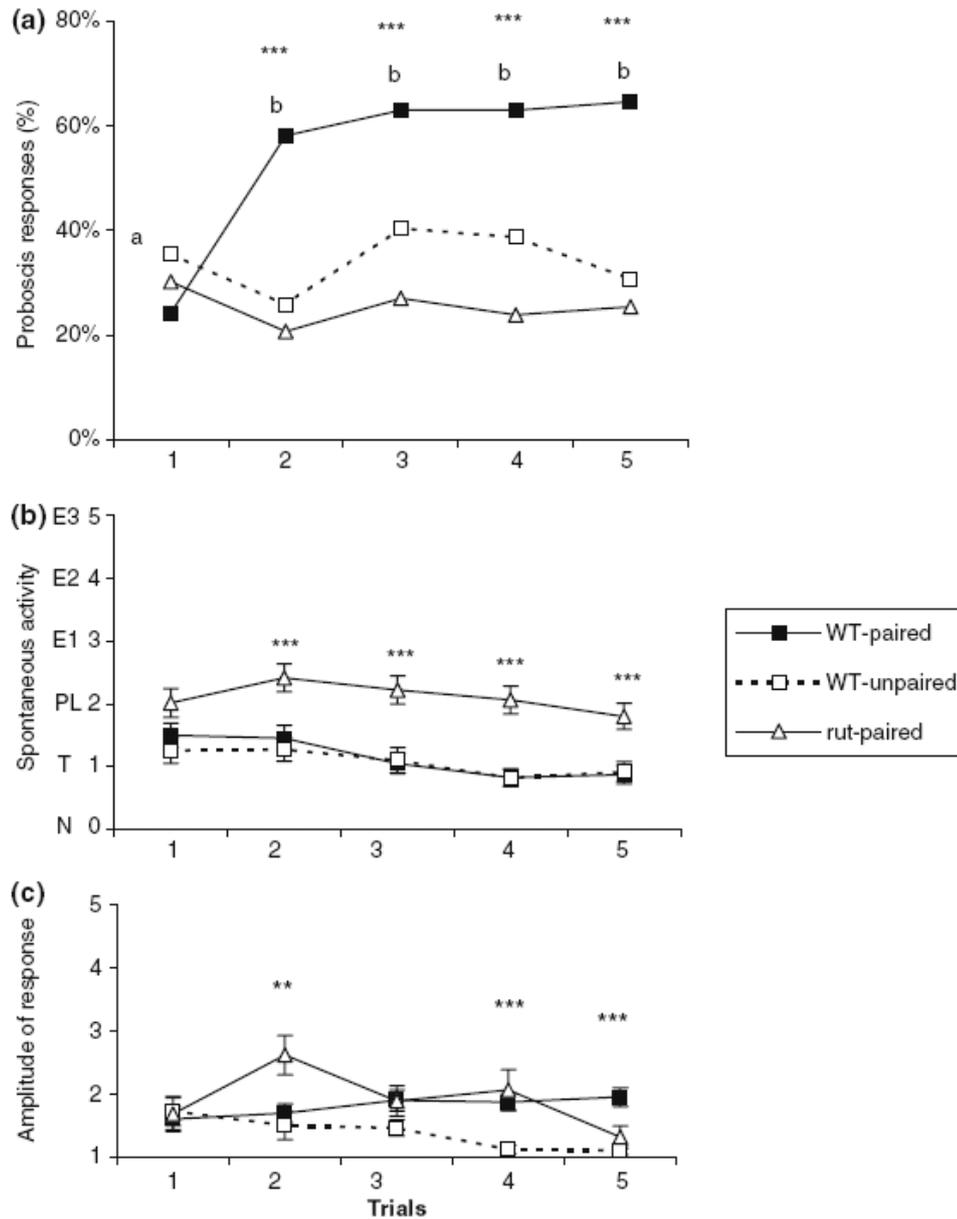


Figure 2: Olfactory appetitive conditioning (Experiment 1): associative learning of a WT strain and learning defect of the *rutabaga* strain. **a** Acquisition curves of starved WT flies trained with paired (WT-paired) or unpaired (WT-unpaired) presentation of US and CS, and of starved *rutabaga* flies trained with paired presentation (*rut*-paired). Ordinate gives the percentage of responses to the banana odour (N = 62-63 flies for each group). **b** Spontaneous proboscis movements observed during the 15 s before the onset of the CS, during each trial, and for each group, according to the 6-point scale (see Fig. 1 for signification of letters; N = 62-63 flies for each group). Each value represents the mean \pm standard error of mean. **c** Amplitude of the responses for each group, corresponding to the difference between levels of proboscis protrusion observed before and during CS presentation. The minimum amplitude of a response is thus equal to 1, and the maximum to 5 (N = number of responding flies, depending on the trials). Each point represents the mean \pm standard error of mean. Stars indicate a significant difference among the groups (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001); see text to know which values are different from one another. Letters indicate a significant difference between points of a curve at P < 0.05.

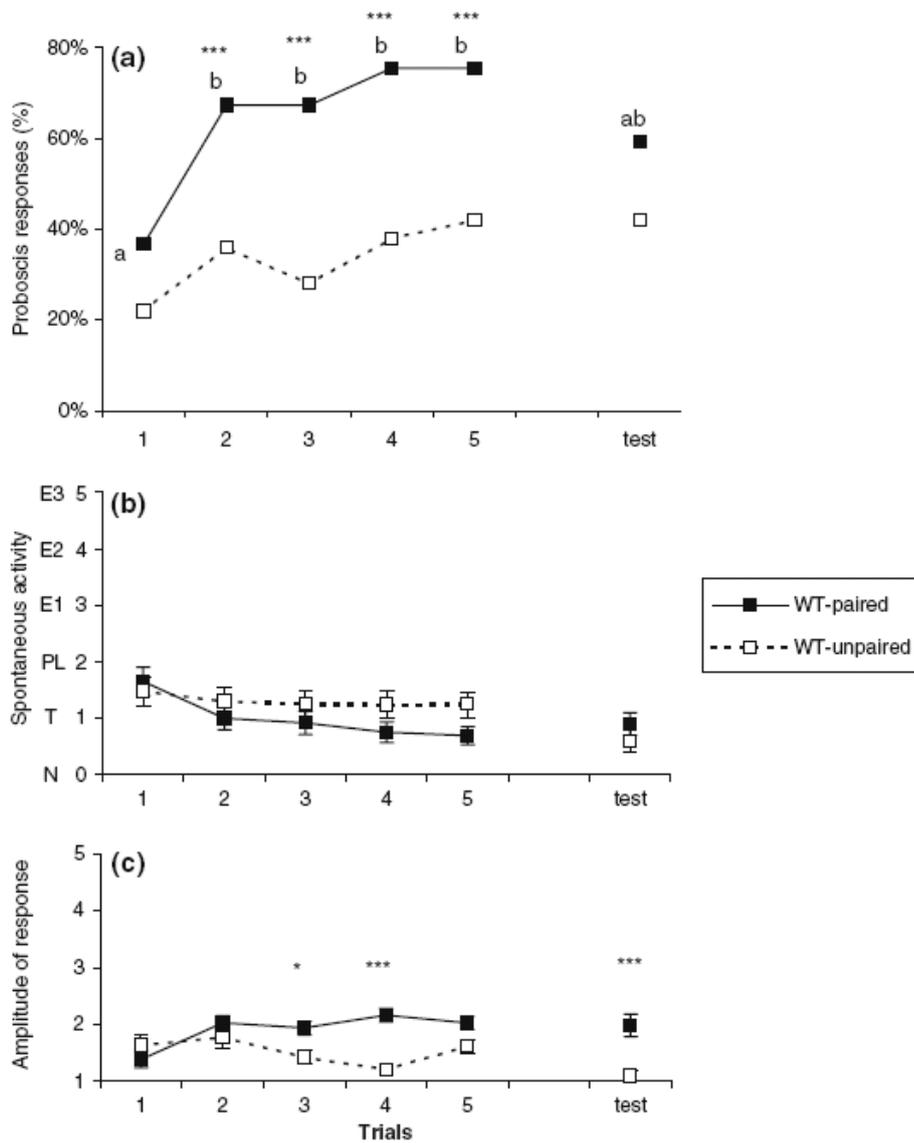


Figure 3: Olfactory appetitive conditioning (Experiment 2): associative learning and short-term memory in WT flies. **a** Acquisition curves of starved flies trained with paired (WT-paired) or unpaired (WT-unpaired) presentation of US and CS. The memory test was performed for both groups 1 h after the last training trial. Ordinate gives the percentage of responses to the banana odour (N = 49-50 flies for each group). **b** Spontaneous proboscis movements observed during the 15 s before the onset of the CS, during each trial, and for each group, according to the 6-point scale (see Fig. 1 for signification of letters; N = 49-50 flies for each group). **c** Amplitude of the responses for responding flies of the WT-paired and unpaired groups, as explained in the legend of Fig. 2 (For explanation of stars and letters, see the legend of Fig. 2).

Slight increase of amplitude of the conditioned response

The amplitude of response became significantly different between the paired and unpaired groups from trial 3 to 5 in experiment 1 and at trial 3 and 4 in experiment 2 (Figs. 2c, 3c; $P < 0.046$; $z > 1.69$; 1 df). In the WT-paired group the amplitude slightly increased and reached 1.9 ± 0.1 points and 2.1 ± 0.1 points respectively in experiments 1 (from trial 3) and 2 (from trial 2), corresponding to a transition from N or T before stimulation to PL or E1 during odour

stimulation. The unpaired procedure yielded slightly smaller amplitude of response in both experiments, from N or T before to T or PL during odour stimulation.

In the *rutabaga* group, the few responding flies showed a significantly higher amplitude of response than in the unpaired group at trials 2 and 4 (Fig. 2c; $P < 0.008$; $z > 2.65$, 1 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$), but not at trials 3 and 5 (Fig. 2c; $P > 0.17$; $z < 1.38$; 1 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$). Thus, whereas the percentage of response was similar in paired *rutabaga* flies and unpaired WT flies, there was an effect of the paired procedure on the amplitude of responses in the mutant. However, this effect was unstable.

No observable memory 1h after conditioning

The response percentages of WT-paired (59 %) and WT-unpaired (42 %) groups did not differ significantly in a memory test one hour after conditioning (Fig. 3a; $P > 0.25$; $\chi^2_{Haber} = 0.66$; 1 df). In addition, in both paired and unpaired groups, response percentages at the test were not significantly different from that in the first trial (Fig. 3a; $P > 0.03$; $Z < 2.4$; 1 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$). The individual analysis shows that the probability of response in the memory test did not depend on the probability of response during the training procedure: in fact, flies responding and flies not responding at the test had the same individual mean number of CR during the training phase, in both the paired and the unpaired group (no Fig.; $P > 0.26$; $z < 1.14$; 1 df; Ns: see Fig. 3a). However, the amplitude of responses during the test remained higher in the paired group than in the unpaired group (Fig. 3c; $P < 0.001$; $z = 3.48$; 1 df).

No change of the food intake during training procedures

In both experiments, food motivation for the US did not decrease significantly during the training procedure and the test in any group, with more than 96 % of flies showing a complete food intake in all 5 trials. The remaining flies took a drop of sucrose solution but stopped their food intake before 5 s.

Effect of low-sugar diet vs. starvation on mortality, food motivation and learning.

The absence of significant memory 1 h after conditioning might be partly due to a suboptimal physiological state of the starved flies. Indeed, preliminary starvation experiments indicated 50 % mortality of the *Canton-S* flies within 24 h after conditioning (data not shown). One solution was to replace starvation by a low sugar diet, to increase survival and energy for learning, while maintaining the food motivation needed for the conditioning paradigm.

Mortality

We compared the mortality of flies that were starved or fed with low-sugar diets, *i.e.* 15 mM sucrose, trehalose or glucose solutions (15 mM sucrose diet ensured survival for at least 72 h

and high food motivation for a 0.5 M sucrose solution in *D. melanogaster* females, Edgecomb *et al.* 1994). Flies were maintained on these diets for 7 days, with food being renewed every 2 days. The percentage of mortality was recorded every 24 h.



Figure 4: Effect of low-sugar diets and starvation on mortality. Percentage mortality over time of females of the WT strain, fed *ad libitum* for up to 7 days on 15 mM glucose, trehalose or sucrose diet compared to starved females. Each point represents the mean \pm standard error of the mean of 4-5 trials of 10 flies each.

Flies fed with water or 15 mM glucose solution died rapidly, with a half-life of 48 h and 55 h respectively (Fig. 4). Flies survived longer when fed with disaccharides, with a half-life of 3 days for the 15mM trehalose diet and of 5.5 days for the 15 mM sucrose diet. For the trehalose and sucrose diets, no mortality was observed at 48 h, whereas 20 % and 50 % mortality were recorded on 15 mM glucose and water respectively. Both disaccharides were good candidates for use as a low-sugar diet, but we chose trehalose for the following experiments to limit flies experience with sucrose, which was used as the US.

Learning and memory performance as a function of nutritional treatments

We used the olfactory appetitive conditioning of proboscis activity to compare conditioned responses of flies subjected to starvation and a low-concentration trehalose diet. The paired and unpaired procedures were applied to both groups.

No difference of the food intake between trehalose-fed flies and starved flies

Food motivation did not differ between both nutritional treatments (no Fig.; $P > 0.10$; $\chi^2_{Haber} < 2.44$; 1 df; Ns: see Fig. 5a-b). There was a slight decrease in food intake from 100 % to 95 % on average at trial 5 (no Fig.; trehalose diet: $P = 0.023$; $Q = 11.33$; 4 df; Ns: see Fig. 5b; starvation data did not fulfil the conditions of Cochran test application), and 96 % on average 1 h after the training phase, checked after the memory test.

Learning curve

At the first trial, neither the treatment nor the training procedure had any significant effect on the percentage of response to banana odour (Fig. 5a-b; $P > 0.10$; $\chi^2_{Haber} < 1.66$; 1 df). In subsequent trials, the paired group of starved flies showed a significant increase in the percentage of responses (Fig. 5a; $P = 0.012$; $Q = 12.77$; 4 df), reaching a mean plateau level of 35 % from trial 2. For trehalose-fed flies, the paired group showed also a significant but more progressive increase in CR until trial 4 (Fig. 5b; $P = 0.038$; $Q = 8.45$; 3 df) followed by a non-significant decrease at trial 5 (Fig. 5b; $P = 0.32$; $Z = 1.01$; 1 df). In contrast, flies of both treatments trained with the unpaired procedure showed a 14-15 % response on average with no significant change between trial 1 and trial 5 (Fig. 5a-b; $P > 0.24$; $Q < 5.48$; 4 df). The percentage of response became higher in the paired group than in the unpaired group from trial 2 to trial 5 in the case of starvation (Fig. 5a; $P < 0.05$; $\chi^2_{Haber} > 4.08$; 1 df) and only at trial 3 and 4 in the case of the trehalose diet (Fig. 5b; $P < 0.05$; $\chi^2_{Haber} > 3.20$; 1 df). This result shows that learning performance is better after starvation than following a trehalose diet.

Individual learning performance

With starvation and the trehalose diet respectively, 75 % and 62 % of flies in the paired group versus 38 % and 44 % of flies in the unpaired group showed at least one response to the odour during the experiment. The individual probability of responding was increased with the paired procedure only in the case of the starvation treatment, with a mean number of 1.9 ± 0.1 CR per responding fly for the paired group and 1.3 ± 0.1 CR for the unpaired group (no Fig.; $P = 0.008$; $z = 2.41$; 1 df; Ns: see Fig. 5a), whereas the trehalose-fed flies had a mean number of 1.4 ± 0.1 CR per responding fly on average in both groups (no Fig.; $P = 0.37$; $z = 0.33$; 1 df; Ns: see Fig. 5b).

Amplitude of the conditioned response

For both nutritional treatments, the CR amplitude was not increased by the training procedure (Fig. 5c-d; $P > 0.13$; $z < 1.11$; 1 df). It corresponded to a transition from T before stimulation to PL or E1 during the odour stimulation.

No observable memory 1h after conditioning

Upon testing, percentage of responses of paired and unpaired groups did not differ significantly, either after starvation or after the trehalose diet (Fig. 5a-b; $P > 0.75$; $\chi^2_{Haber} < 0.09$; 1 df). The unpaired group of starved flies responded more at the test than at the fifth trial, but with a marginally significant difference (Fig. 5a; $P = 0.02$; $Z = 2.36$; 1 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$). In addition, following either nutritional treatment, the percentage of response was not significantly different between the test and the first trial in

both paired and unpaired groups (Fig. 5a-b; $P > 0.04$; $Z < 2.06$; 1 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$). For both treatments, the individual analysis shows that flies responding and flies not responding at the test had the same individual number of CR during the training phase, in the paired as in the unpaired group (no Fig.; $P > 0.11$; $z < 1.59$; 1 df; Ns: see Fig. 5a-b). Thus, the probability of response during the memory test did not depend on the probability of response during the training procedure. Finally, there was no difference in the amplitude of responses in the test between paired and unpaired groups of both treatments (Fig. 5c-d; $P > 0.29$; $z < 1.06$; 1df).

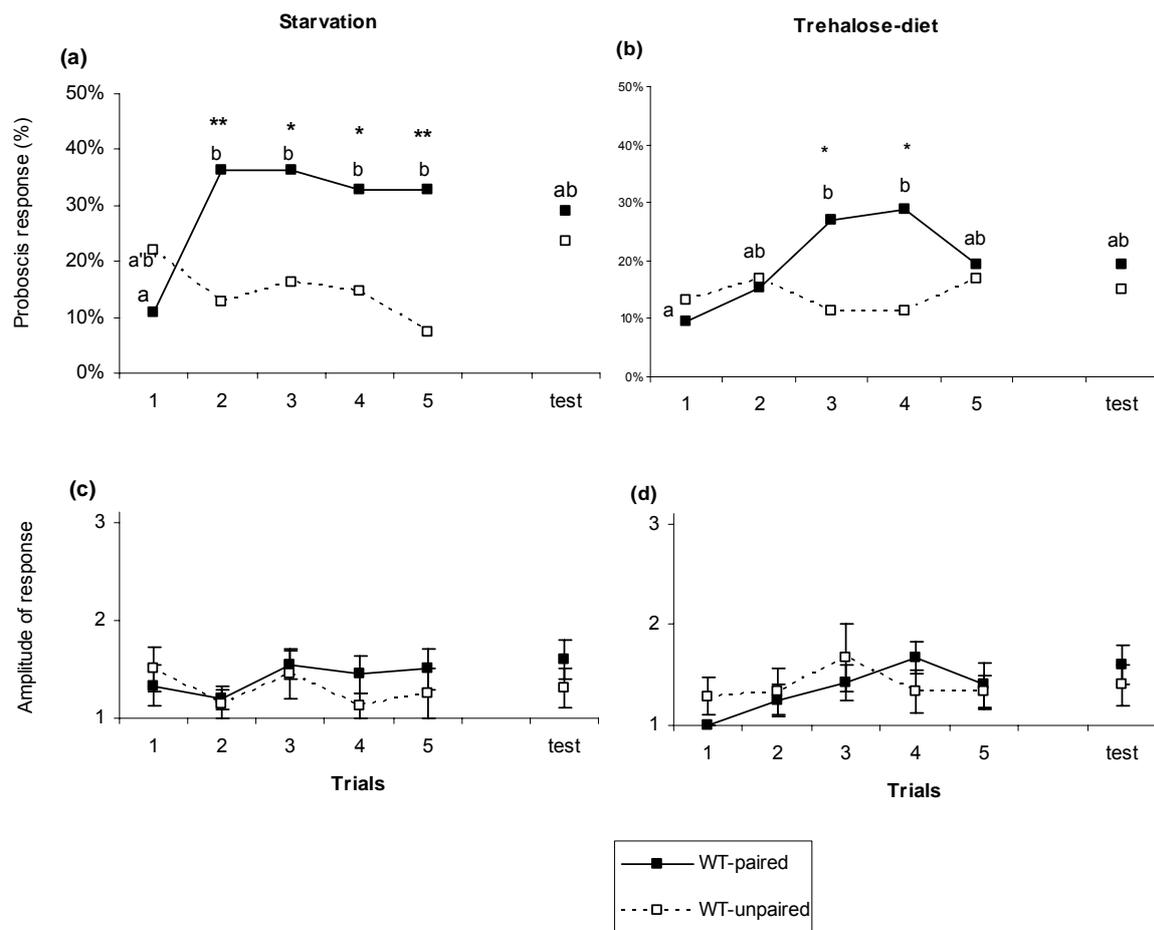


Figure 5: Effect of trehalose diet vs. starvation on learning and memory performance. **a, b** Acquisition curve for paired and unpaired presentation of US and CS, for starved flies (**a**) or for trehalose-fed flies (**b**). The ordinate gives the percentage of responses to the banana odour (N = 52-55 flies for each group). **c, d**: Amplitude of the responses for responding flies of the WT-paired and unpaired groups, as explained in the legend of Fig. 2, using starved flies (**c**) and trehalose-fed flies (**d**) (For explanation of stars and letters, see the legend of Fig. 2).

Spontaneous activity does not determine the percentage of conditioned response

For both nutritional treatments, the paired and the unpaired groups displayed similar spontaneous activities until the test (no Fig.; $P > 0.38$; $z < 0.87$; 1 df; Ns: see Fig. 5a-b), so the spontaneous proboscis activity did not determine the probability of CR in the paired groups.

Food motivation: responsiveness to the US

We monitored the percentage and amplitude of proboscis responses to tarsal sucrose stimulation, in starved and trehalose-fed flies, with the methodology described in section “Data recording”, using sugar instead of the odour. This proboscis reflex was tested on restrained flies by stimulating the left front tarsus with the US for 5 s.

Trehalose-fed flies presented significantly fewer unconditioned responses (UR) than starved flies (Table 1; $P < 0.05$; $\chi^2_{Haber} = 4.79$; 1 df). UR was characterised by a mean amplitude of 2.7 ± 0.2 points, without a significant difference between the two nutritional treatments (Table 1; $P > 0.73$; $z > 0.34$; 1 df). This UR amplitude corresponded to a transition from T or PL before stimulation to partial or full extension of proboscis (E2 or E3) during sucrose stimulation.

	starvation	trehalose-diet
number of tested flies	32	69
% proboscis response to US	94%	72%
amplitude of response	2.6 ± 0.3	2.7 ± 0.2

Table 1. Comparison of responsiveness to tarsal stimulation with sucrose (US) between starved flies and trehalose-fed flies.

Naive proboscis responses to appetitive and non-appetitive odours

In restrained flies, we recorded percentage and amplitude of proboscis response to odours of octanol (3-octanol, Fluka[®]), apple cider vinegar (Amora[®], 5°), banana (Haarmann & Reimer[®], ref.209725) and to the non-odorized airflow. Octanol is known to repel *D. melanogaster* (Heisenberg et al. 1985). The odour of cider vinegar has been shown to be attractive for *D. melanogaster* in natural as well as experimental conditions (Frye et al. 2003). Banana odour was predicted to be appetitive, at least when emitted by the whole fruit, but preliminary experiments with the flavour in an olfactometer failed to show attraction (data not shown). All

flies used in this experiment were starved for 24 h. Responses to non-odorized airflow were considered as background noise, and served as control.

	air	octanol	banana	cider vinegar
number of tested flies	50	50	91	82
% proboscis response	14%	18%	20%	38%
amplitude of response	1.6 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.2

Table 2. Responsiveness of naive flies to odours of octanol, banana, cider vinegar and to a non-odorant airflow.

Response percentages to octanol and banana stimulations was not significantly different from the control group (Table 2; $P > 0.69$; $\chi^2 < 0.74$; 2 df). In contrast, flies responded significantly more to the cider vinegar stimulation with a 38 % response (Table 2; $P = 0.004$; $\chi^2 = 13.25$; 3 df; Dunn-Sidak correction, $\alpha' = 0.025$). The amplitude of response did not differ significantly among the three odours and control groups, with a mean of 1.6 ± 0.1 (Table 2; $P = 0.92$; $H = 0.47$; 3 df). These olfactory responses corresponded to small proboscis movements, from T or PL before stimulation to PL or E1 during odour stimulation.

DISCUSSION

Associative learning

First of all, we have developed an associative conditioning paradigm for proboscis activity in *Drosophila melanogaster*, in which flies learn to anticipate a sugar reward by moving their proboscis in response to an odour. Our conditions allowed us to obtain reproducible associative learning. Since the unpaired group did not show increased responsiveness to banana odour during conditioning, remaining at a level of responses significantly lower from that of the paired group, we can rule out that the improved performance of the paired group was due to sensitisation induced by the repeated sugar presentation. Thus, a non-associative basis seems unlikely to explain our results. There was no evidence of learning in *rutabaga* flies, at least when compared with the WT flies. A *rutabaga* unpaired group would help to characterize its conditioning defect. Important learning defect was already found by Tempel *et al.* (1983) and Schwaerzel *et al.* (2003) in the odour-sugar conditioning. This suggests that the *rut*-encoded adenylyl cyclase is required for this associative learning.

Characteristics of the CR

The three learning curves obtained for starved flies were characterised by a 30 % increase of CR, regardless of the level of response in the first trial. The individual analysis showed that the learning curves were due to an increase of both the number of responding flies and the number of responses per fly. The establishment of a new scale of proboscis movements was an important parameter of our study, because the small amplitude of proboscis movements characterizing the CR in *Drosophila* might not allow observation of associative learning if we had used the existing scale (Vaysse 1982). For instance we quantified additional movements, such as those of the maxillary palps, which participate in odour detection (de Bruyne *et al.* 1999). Maxillary palp movements might be a component of food foraging behaviour and might improve the localization of the odour source, as has been observed for antennal movements in others species (honeybee: Lambin *et al.* 2005; cockroach: Lent *et al.* 2004). The amplitude of the CR was significantly smaller than the UR to sucrose, which corresponded mostly to full extensions of proboscis. The CR is therefore not identical to the behaviour of food intake, but would correspond rather to its initiation, or to an excitatory state denoting the recognition of the olfactory appetent stimulus. In this regard, we propose to term the *Drosophila* CR “Conditioned Proboscis Activity” rather than “Conditioned Proboscis Extension”. In addition, naive proboscis responses to the different olfactory stimulations or conditioned responses to banana odour were always of the same small amplitude. We observed that associative conditioning tended to increase the amplitude of the response in both WT and *rutabaga* flies, but it was not significant at every trial and in all experiments. In contrast with the amplitude, the percentage of proboscis response to an odour was higher when the odour was appetitive, with the same rate of response presented by naive flies to the vinegar odour and conditioned flies to the banana odour. These findings indicate that the probability of response to an odour reflects its appetitive character better than the amplitude of the responses.

One current problem with this paradigm is the occurrence of spontaneous proboscis movements, which limit the observation of odour responses. In a supplementary experiment, we observed that during 5 successive 15 s periods, spontaneous movements from PL to E3 occurred at least once in 78 % of mounted flies (as described in section “Experimental device”; N = 32 flies), in 55 % of immobilized flies inside the tip (N = 15 flies), and in 17 % when flies could move within a 1-2 mm space (N = 8 flies). This shows that the more flies were immobilized, the higher the probability of spontaneous proboscis movement. Being mounted may induce a form of stress in flies, expressed by spontaneous proboscis activity, as well as repetitive flapping of the front leg tarsi, observed frequently in restrained flies. However, our analyses showed that occurrence of a conditioned response to banana odour

was not determined by the spontaneous proboscis activity, but resulted from learning to anticipate the reward by moving the proboscis during the odour presentation.

Comparison with other insect models

With the present procedure in *Drosophila*, there was on average an increase of 30 % in CR in the paired group. This is still inferior to the levels obtained with some other insect models: 70-80 % in honeybees (*Apis mellifera*; Bitterman *et al.* 1983; Fresquet *et al.* 1998) and 50-60 % in moths (*Heliothis virescens*; Hartlieb 1996; Skiri *et al.* 2004), but remains within the same range as those obtained for bumble bees (*Bombus terrestris*; Laloï *et al.* 1998). Here, the learning kinetics of *Drosophila* were characterised by a maximal number of CR after one training trial, as has been observed in the honeybee (Menzel and Bitterman 1983), whereas the maximum of CR was reached less rapidly in the moth (after 5 to 6 trials: Hartlieb 1996). The CR in *Drosophila* is characterised by relatively small proboscis extension movements. It should be noted that in honeybee, the CR is not always identical to the UR, and is also characterised by various levels of proboscis protrusion. Like bumble bees, most flies did not maintain CR upon successive conditioning trials. This property of non-maintained CR has already been observed in other paradigms of individual conditioning in *Drosophila*, such as the conditioned inhibition of the proboscis extension reflex, which induces CR in about 7 trials out of 30 (Fresquet *et al.* 1998). General lower performance in *Drosophila* and bumble bees could be partly due to the novelty of the paradigm in these species, because of not yet optimized experimental parameters. Highest performances of the honeybee might be related to the behavioural repertoire of forager worker bees, frequently emptying crop at the hive. Forager bees thus maintain a higher motivation for sugar and a correlated better learning performance than non-forager bees (Ray and Ferneyhough 1999; Scheiner *et al.* 2003) and male honeybees (Laloï 1999). Food motivation would be more limited in *Drosophila*, for which sugar intake is only a source of energy for the individual.

Nutritional state and learning performance

The influence of the nutritional state on food motivation in *Drosophila* could also explain the more limited learning performance of trehalose-fed flies when compared with starved flies in our study. Sugar intake was identical in both nutritional states during the training procedure, but trehalose-fed flies showed a lower probability of sugar response with tarsal reflex than starved flies. Poor learning performance in trehalose-fed flies may come from a reduced food motivation, decreasing the value of the reward during the conditioning procedure. Indeed, food intake may be a poorer indicator of food motivation than the tarsal reflex. Thus, tarsal sensitivity would depend on food motivation to a higher degree than sensitivity of the

labellum, as suggested by differences in electrophysiological responses of gustatory sensilla of both structures (Ishimoto and Tanimura 2004). In addition, the sugar pathway from the labellum and from the tarsi projects to specific locations in the suboesophageal ganglion (SOG), which could cause this difference in responsiveness to sugar (Wang *et al.* 2004). Poor learning performance in trehalose-fed flies could also result from pre-exposure to sugar without the CS. However, we chose trehalose because its perception is mediated differently to other sugars, via a specific receptor (Gr5a; Dahanukar *et al.* 2001). It should therefore have a limited impact on perception of the US, at least at the peripheral level.

Stability of the memory trace

In our conditions, the learning curve showed that the CS-US association was remembered for at least 15 min (time interval between each trial), but there was no clear evidence of memory 1 h after conditioning. The amplitude of the 1 h response tended to be higher in the paired group, but this was significant only in one experiment. Although the percentage of response was still high, it was not significantly different from the unpaired group, neither at group nor at individual levels. Thus, we cannot reliably detect an associative component in the response 1 h after conditioning. In the unpaired group of the experiment of Fig. 5, it is unlikely that the increase of responses between the fifth trial and the test would result from sensitisation. If significant sensitisation occurred as a result of repeated presentations of the sugar, we would expect an increase in the percentage of responses along the acquisition trials for both groups, which is obviously not the case. In addition, the percentage of responses in paired and unpaired groups during the test were not different from the initial value (trial 1). While we have so far been unable to demonstrate in *Drosophila* a capacity to remember food-associated odour for more than 15 minutes at the level of proboscis activity, memory has been observed to persist for 24h in the case of orientation behaviour (Tempel *et al.* 1983). This difference raises the question of which neuronal pathways are involved in the formation and recall of consolidated memory.

Neuronal pathways

The fact that our protocol allows individual immobilized flies to learn may represent an important benefit for live imaging studies. For example, the paradigm could be used in combination with fluorescence-based calcium probes to visualise neural activity during learning, and may contribute to our understanding of the associative learning pathway involved in olfactory appetitive conditioning. Conditioning proboscis activity to a sugar-associated odour implies that both odour and sugar pathways converge, more or less directly, and that processed information can activate some motor neurons innervating the proboscis

muscles. The afferent pathway of isoamyl acetate (a main component of banana odour) has been studied from its perception on palps and antennae to its mediation via the labial nerve or via the antennal nerve to specific glomeruli of the antennal lobes (de Bruyne *et al.* 1999; Hallem *et al.* 2004). The afferent pathway of the US sucrose (reviewed by Scott 2005) is known from its perception on the proboscis labellum, the tarsi and in the pharynx, to its mediation to different locations in the SOG. Recently, taste cell activity in response to sugar has been successfully monitored *in vivo* using calcium imaging (Marella *et al.* 2006). The proboscis extension reflex is directly controlled by motoneurons from the SOG. Projection of output neurons from the SOG toward higher brain centres is as yet poorly characterised. In *Drosophila*, like the blowfly (Edgecomb and Murdock 1991), there is no VUM-like neuron such as that identified in the honeybee. This neuron carries sugar information by arborisation into the SOG and different neuropils involved in odour processing such as the antennal lobes and the mushroom-body calices, allowing convergence of sugar and odour signals (Hammer 1993; Menzel 2001). In *Drosophila*, recent research suggests that the antennal lobes might be a possible area mediating olfactory aversive learning in addition to a previously accepted and central role for the mushroom bodies (Yu *et al.* 2004; Davis 2005). Use of proboscis activity conditioning in *Drosophila* could help determine the existence and localisation of sites of stimuli convergence in the case of a sucrose US.

In conclusion, this work provides the first successful attempt of olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila*. This paradigm complements the classical electric shock conditioning by providing individual data and appetitive reinforcement. Furthermore, the development of this paradigm may become a helpful tool for the better understanding of olfactory learning mechanisms, considering progress realised with conditioned proboscis extension in the honeybee and the powerful genetic tools available in *Drosophila*. A particularly interesting application of conditioned proboscis activity would be to visualize pathways of olfactory learning, with *in vivo* functional imaging.

Acknowledgments This work was started at the “Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés”, INRA and completed at the laboratory “Développement, Évolution et Plasticité du Système Nerveux”, CNRS. The authors thank Philippe Vernier for his scientific support to the project, David Laloi, Jean-Christophe Sandoz and Isabelle Bonod for sharing their experience and ideas with the conditioned proboscis activity protocol, Michel Chaminade, Jean-Yves Tiercelin and Pascal Abbas for installation, adaptation and maintenance of the system, Tazu Aoki and Guillaume Isabel for fruitful discussion and Niki Scaplehorn for linguistic advice. This study was supported in part by the “Agence Nationale

pour la Recherche” and “the Fondation Bettencourt Schueller”, and Marie-Ange Chabaud was supported by the “Ecole Doctorale Sociétés et Vivant”, option “Biologie du Comportement”, at the University Paris 13.

REFERENCES

- Ackerman SL and Siegel RW (1986) Chemically reinforced conditioned courtship in *Drosophila*: responses to wild-type and the dunce, amnesiac and don giovanni mutants. *J Neurogenet* 3: 111-123
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A and Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 97: 107-119
- Campan R and Scapini F (2002) Ethologie, approche systématique du comportement. De Boeck Université, Bruxelles: pp 134 - 136
- Dahanukar A, Foster K, van der Goes van Naters WM and Carlson J R (2001) A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nat Neurosci* 4: 1182–1186
- Davis RL (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28: 275-302
- de Belle SJ and Heisenberg M (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 263(5147): 692-695
- de Bruyne M, Clyne PJ and Carlson JR (1999) Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp. *J Neurosci* 19(11): 4520-4532
- DeJianne D, McGuire TR and Pruzan-Hotchkiss A (1985) Conditioned suppression of proboscis extension in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Psychol* 99(1): 74-80
- Dethier VG, Solomon RL and Turner LH (1965) Sensory input and central excitation and inhibition in the blowfly. *J Comp Physiol Psychol* 60(3): 303-313
- Devaud JM, Acebes A, Ramaswami M and Ferrùs A (2003) Structural and functional changes in the olfactory pathways of adult *Drosophila* take place at a critical age. *J Neurobiol* 56(1): 13-23
- Dudai Y, Corfas G and Hazvi S (1988) What is the possible contribution of Ca²⁺-stimulated adenylate cyclase to acquisition, consolidation and retention of an associative olfactory memory in *Drosophila*. *J Comp Physiol [A]* 162(1): 101-109
- Duerr JS and Quinn WG (1982) Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc Natl Acad Sci USA* 79(11):3646-3650.
- Edgecomb RS and Murdock LL (1991) Central projections of axons from taste hairs on the labellum and tarsi of the blowfly, *Phormia regina* Meigen. *J Comp Biol* 315(3): 431- 444

- Edgecomb RS, Harth CE and Schneiderman AM (1994) Regulation of feeding in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *J Exp Biol* 197: 215-235
- Ejima A, Smith BPC, Lucas C, Levine JD and Griffith LC (2005) Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Curr Biol* 15: 194-206
- Faber T, Joerges J and Menzel R (1999) Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* 2(1): 74-78
- Fan RJ, Anderson P and Hansson BS (1997) Behavioural analysis of olfactory conditioning in the moth *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J Exp Biol* 200: 2969-2976
- Fresquet N, Fournier D and Gauthier M (1998) A new attempt to assess the effect of learning processes on the cholinergic system: studies on fruitflies and honeybees. *Comp Biochem Physiol B* 119(2): 349-353
- Fresquet N (1999) Effects of aging on the acquisition and extinction of excitatory conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Physiol Behav* 67(2): 205-211
- Frye MA, Tarsinato M and Dickinson MH (2003) Odor localization requires feedback during free flight in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 206: 843-855
- Hallem EA, Ho MG and Carlson JR (2004) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* 117: 965-979
- Hammer M (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366: 59-63
- Hartlieb E (1996) Olfactory conditioning in the moth *Heliothis virescens*. *Naturwissenschaften* 83: 87-88
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S and Byers D (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2: 1-30
- Holliday M and Hirsch J (1986) Excitatory conditioning of individual *Drosophila melanogaster*. *J Exp Psychol: Anim Behav Processes* 12(2): 131-142
- Ishimoto H and Tanimura T (2004) Molecular neurophysiology of taste in *Drosophila*. *Cell Mol Life Sci* 61(1): 10-8
- Isabel G, Pascual A and Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304: 1024-1027
- Laloi D, Sandoz JC, Picard-Nizou AL, Marchesi A, Pouvreau A, Taséi JN, Poppy G and Pham-Delègue MH (1998) Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. *Entomol Exp Appl* 90: 123-129

- Laloi D (1999) Reconnaissance d'odeurs complexes par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et le bourdon (*Bombus terrestris* L.): facteurs épigénétiques et génétiques de la plasticité comportementale. Diploma Thesis, Paris XI University, Orsay, France
- Lambin M, Déglise P and Gauthier M (2005) Antennal movements as indicators of odor detection by worker honeybees. *Apidologie* 36: 119-126
- Lent DD and Kwon HW (2004) Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach *Periplaneta Americana*. *J Exp Bio* 207: 369-375
- Marella S, Fischler W, Kong P, Asgarian S, Rueckert E and Scott K (2006) Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behaviour. *Neuron* 49: 285-295
- Medioni J, Cadieu N and Vaysse G (1978) Divergent selection for the rapid acquisition of conditioning in *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*). *CR Seances Soc Biol Fil* 172(5): 961-967
- Menzel R and Bitterman ME (1983) Learning by honeybees in an unnatural situation. In: Huber F and Markl H (eds) *Neuroethology and Behavioral Physiology*. Springer-Verlag, Berlin, pp 206-215
- Menzel R (2001) Searching for memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem* 8(2): 53-62
- Milosevic NJ (1999) Dunce and amnesiac gene effect on signal learning in fruit flies *Drosophila melanogaster*: experiments with odors. *Russ J Genet* 35(2): 157-163
- Müller U (2002) Learning in honeybees: from molecules to behaviour. *Zool* 105: 313-320
- Pascual A and Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294: 1115-1117
- Preat T (1999) Testing associative learning in *Drosophila*. In: Crusio WE and Gerlai RT (eds.) *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behaviour research* (Techniques in the behavioural and neuronal sciences). Elsevier Science BV, 13: pp 79-126
- Quinn WG, Harris WA and Benzer S (1974) Conditioned behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 71(3): 708-712
- Ray S and Ferneyhough B (1999) Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev Psychobiol* 34(1): 21-27
- Riemensperger T, Völler T, Stock P, Buchner E and Fiala A (2005) Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr Biol* 15: 1953-1960
- Sandoz JC, Roger B and Pham-Delègue MH (1995) Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical procedures of the proboscis extension response. *CR Acad Sci Ser III* 318: 749-755

- Sandoz JC, Hammer M and Menzel R (2002) Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learn Mem* 9(5): 337-348
- Scheiner R, Barnert M and Erber J (2003) Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidologie* 34: 67-72
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S and Heisenberg M (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23(33): 10495-10502
- Scott K (2005) Taste recognition: food for thought. *Neuron* 48: 455-464
- Skiri HT, Strandén M, Sandoz JC, Menzel R and Mustaparta H (2004) Associative learning of plant odorants activating the same or different receptor neurones in the moth *Heliothis virescens*. *J Exp Biol* 208: 787-796
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR and Quinn WG (1983) Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Psychology* 80: 1482-1486
- Tully T and Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A* 157: 263-277
- Tully T, Preat T, Boynton SC and Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35-47
- Vargo M and Hirsch J (1982) Central excitation in the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *J Comp Physiol Psychol* 96(3): 452-459
- Vaysse G and Médioni J (1973) Premières expériences sur la gustation tarsale chez *Drosophila melanogaster*: stimulation par le saccharose. *CR Soc Biol* 167(3-4): 560-564
- Vaysse G and Médioni J (1976) Further experiments on the conditioning and pseudoconditioning of the tarsal reflex in the *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*): effect of low intensity electric shocks. *CR Seances Soc Biol Fil* 170(6): 1290-1304
- Vaysse G (1982) Etude du réflexe tarsal et de son inhibition conditionnée chez *Drosophila melanogaster* : déterminants génétiques et épigénétiques. Diploma Thesis, Paul Sabatier University, Toulouse, France
- Wang Z, Singhvi A, Kong P and Scott K (2004) Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell* 117(7): 981-91
- Yu D, Ponomarev A and Davis RL (2004) Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning: memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* 42: 437-449
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall ; Upper Saddle River, N.J. (USA). 663 p
- Zars T, Fischer M, Schulz R and Heisenberg M (2000) Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288(5466): 672-675

PROJET N° 2

CONDITIONNEMENT OLFACTIF APPETITIF DE L'ATTRACTIVITE CHEZ LA DROSOPHILE



CONDITIONNEMENT OLFACTIF APPETITIF DE L'ATTRACTIVITE

I. RESUME DE L'ETUDE

L'objectif de ce projet était de développer le conditionnement appétitif olfactif discriminatif et le test d'attractivité pour l'odeur conditionnée chez la drosophile, le but à terme étant d'obtenir de la mémoire à long-terme, et de comparer les capacités et les mécanismes mnésiques en conditionnements aversif et appétitif, sur des groupes de mouches et des mouches individuelles.

Dans ce second projet, j'ai essentiellement participé aux expériences préliminaires et aux réflexions de mise au point.

Nous avons opté pour la conception d'un barillet de conditionnement appétitif, basé sur le barillet de conditionnement aversif, qui permette de contrôler la présentation des odeurs conditionnelles et du stimulus inconditionnel sucré sans avoir à perturber les mouches en les transférant dans différents compartiments durant le conditionnement. Pour le test, nous avons d'abord envisagé d'utiliser un olfactomètre à 4 voies plutôt que l'appareil de test en T utilisés actuellement dans le paradigme aversif. Un certain nombre d'expériences préliminaires ont donc été réalisées pour mettre au point les tests d'attractivité et d'évitement dans l'olfactomètre à 4 voies. La mise au point s'est avérée encourageante, avec l'obtention de scores de mémoire aversive similaires entre l'olfactomètre et l'appareil de test en T du paradigme de conditionnement aversif. Malgré tout, pour le reste du projet en appétitif, nous avons utilisé l'appareil de test en T, qui permettait une comparaison plus directe avec le conditionnement aversif et un bénéfice important sur le temps imparti au projet.

Nos principaux résultats font l'objet d'une publication en révision dans la revue *Genes, Brain and Behavior*. Ils montrent que les différentes procédures de conditionnement en 1 seul cycle ou en 5 cycles massés et espacés permettent d'obtenir de la mémoire appétitive durable, toujours mesurable 3 jours après. Nous avons démontré en utilisant la drogue cycloheximide que la mémoire obtenue après ces trois procédures de conditionnement était dépendante de la synthèse protéique *de novo* et donc correspondait à de la MLT. Les résultats montrent également que la réponse au sucre et la MCT augmentent avec la durée de jeûne avant conditionnement. Le mutant *rutabaga* a un défaut de MCT mais pas de la réponse au sucre, comme nous l'avons démontré dans le cadre de l'ECP (Chabaud *et al.* 2006). Par contre, nous avons démontré que les mutants *crammer* et *tequila* de MLT ont une réponse au sucre déficiente et ne peuvent donc pas être testés dans le cadre de notre paradigme.

II. PHASE DE MISE AU POINT

Deux voies d'investigation étaient valables: soit rechercher les conditions expérimentales les plus adaptées au développement d'un conditionnement appétitif, soit appliquer les conditions expérimentales du paradigme de conditionnement aversif à celui du conditionnement appétitif pour pouvoir les comparer immédiatement. Nous avons testé les deux démarches, avec dans un premier temps l'adaptation des conditions expérimentales du paradigme aversif à celui de l'appétitif. Les expériences préliminaires présentées ci-dessous se rapportent à cette première voie d'investigation. Elles ont visées à l'adaptation du dispositif de test (appareil de test en T ou olfactomètre 4 voies) et au choix de la nature et des concentrations des stimuli olfactifs. Puis je décris la phase de mise au point du conditionnement appétitif, avec la confection d'un barillet de conditionnement appétitif.

2.1 Recherche d'un couple d'odeur neutre ou appétitif en olfactomètre à 4 voies et en appareil de test en T

2.1.1 Recherche des concentrations auxquelles des odeurs aversives deviennent neutres

Objectif

Rechercher les concentrations de l'odeur OCT et de l'odeur MCH permettant de ne plus engendrer de répulsion par rapport à de l'air chez les mouches en olfactomètre à 4 voies.

Protocole

Nous avons établi une gamme de dilution de facteur 10 (de 58 à 0.58 μl , effectuée en ordre croissant pour éviter les pollutions d'odeur) des odeurs OCT et MCH pour tester la répulsion des mouches naïves envers ces odeurs par rapport à de l'air seul en olfactomètre à 4 voies. Les tests ont été effectués sur 7-9 groupes de 10-15 mouches naïves de la souche *CS* du laboratoire (*CS gif*), en diète sur du tréhalose à 0.015M depuis 24 h. Le nombre de mouches présentes dans chacune des 2 zones de l'olfactomètre a été compté au bout de 1, 2 et 3 min.

Résultats (Fig. 20)

La concentration des odeurs OCT et MCH doit être divisée par 100 (0.58 μl , soit $3.6 \cdot 10^{-6}\text{M}$) pour qu'elles ne soient plus significativement répulsives par rapport à de l'air (OCT_{0.58 μl} vs air: $t = 1.8$, $P = 0.11$, 8 ddl; MCH_{0.58 μl} vs air: $t = 0.63$, $P = 0.55$, 6 ddl).

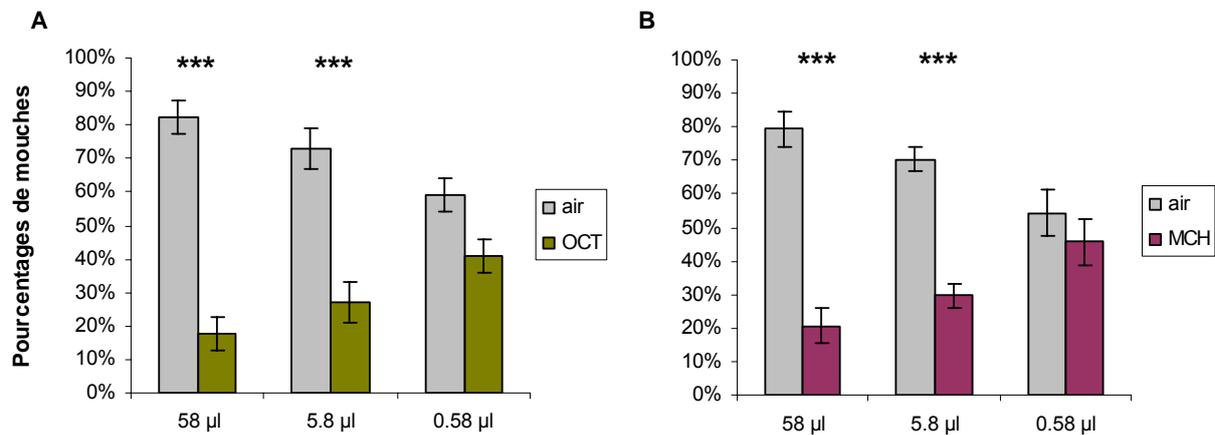


Figure 20: Recherche des concentrations maximums de OCT et MCH permettant de ne plus engendrer de répulsion par rapport à de l'air chez des mouches naïves en olfactomètre à 4 voies. La gamme de concentration est représentée en abscisse par le volume de l'odeur à diluer dans 160 ml d'huile paraffine (soit des concentrations de $3.6 \cdot 10^{-4}$ à $3.6 \cdot 10^{-6}$ M). Le graphique représente le pourcentage moyen de mouches présentes dans la zone du flux d'air non-odorant et du flux d'air odorant au bout de 3 min de test (n=7-9 groupes). Les étoiles signalent une différence significative avec une p-value * < 0.05, ** < 0.01 ou *** < 0.001.

2.1.2 Comparaison de l'olfactomètre à 4 voies et de l'appareil de test en T: test de l'attractivité pour l'odeur de vinaigre de cidre

Objectif

Comparer le score individuel d'attractivité pour l'odeur de vinaigre de cidre par rapport à de l'air, dans l'olfactomètre à 4 voies et l'appareil de test en T.

Protocole

L'expérience a été réalisée le même jour, avec des mouches (souche CS G) provenant des mêmes bouteilles, dans deux pièces séparées pour les deux appareils de test, avec deux expérimentateurs: moi pour l'appareil de test en T et Laure Kaiser pour l'olfactomètre à 4 voies. L'expérience est réalisée en lumière rouge, mais d'une plus forte intensité dans la pièce expérimentale de l'olfactomètre à 4 voies que dans celle de l'appareil de test en T. Les mouches, à jeun depuis 22-24h au moment du test, sont testées individuellement. La solution de vinaigre de cidre est déposée pure (non diluée) à raison de 5 ml dans une fiole en verre raccordée sur une seule branche des appareils de test. Une fiole vide est également raccordée à chacune des autres branches des appareils et laisse passer de l'air non-odorant.

Un flux de 150 ml/min dans chaque branche de l'appareil de test en T (soit 300 ml/min au total) et 200 ml/min dans chaque branche de l'olfactomètre à 4 voies (soit 800 ml/min au total) est aspiré au centre des appareils. On laisse la mouche faire son choix pendant 1 min (temps habituellement utilisé pour les tests de la mémoire aversive en appareil de test en T).

Le score d'attractivité est mesuré par un score de durée dans l'olfactomètre à 4 voies, et par un score de position dans l'appareil de test en T.

Résultats (Fig. 21)

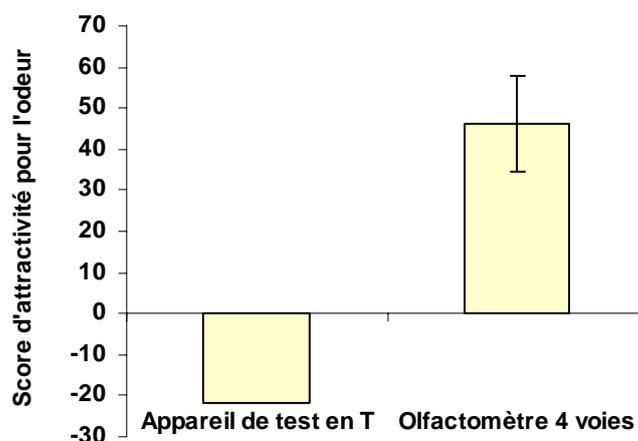


Figure 21: Attractivité pour l'odeur de vinaigre de cidre dans l'appareil de test en T et l'olfactomètre à 4 voies. Le score mesuré dans l'appareil de test en T est basé sur la position des mouches au bout de 1 min (n=61). Le score mesuré dans l'olfactomètre à 4 voies correspond à la moyenne des scores individuels, calculés sur la base du temps passé dans l'odeur par rapport aux 3 autres zones (n=39).

L'appareil de test en T paraît moins adéquat que l'olfactomètre à 4 voies pour mesurer de l'attractivité. Il est possible que l'appareil de test en T soit un environnement stressant pour les mouches, mieux adapté pour les tests d'évitement d'odeur que pour les tests d'attractivité. Les différences de flux et de luminosité pourraient peut-être également influencer le choix des mouches, mais ne sont sans-doute pas à l'origine d'une telle différence d'attractivité. L'odeur utilisée pure paraît peut-être trop concentrée dans l'appareil de test en T et en devient répulsive par rapport à l'air, même pour des mouches à jeun.

D'autres essais ont été effectués dans l'appareil de test en T en augmentant le flux à 200 ml/min dans les deux branches et en jouant sur le paramètre de luminosité, en testant d'autres odeurs censées être appétitives pour la drosophile (banane, poire, champignon, odeur de levures fermentées), en divisant par 2 le volume de solution odorante dans la fiole, mais les scores d'attractivité étaient toujours négatifs (pas de figure). Il paraissait donc préférable, dans un premier temps, d'utiliser l'olfactomètre à 4 voies pour tester l'attractivité pour une odeur appétitive.

La prochaine étape était de mettre au point le test de mémoire aversive en olfactomètre à 4 voies, pour qu'à terme les performances de mémoire appétitive et aversive puissent être comparées dans l'olfactomètre à 4 voies.

2.2 Mise au point du test de la mémoire aversive en olfactomètre à 4 voies

2.2.1 Un début difficile...

Pour cette phase du travail, nous avons utilisé un nouvel olfactomètre un peu plus petit construit dans le cadre du projet d'adaptation de l'olfactomètre à la drosophile. Un certain nombre d'expériences préliminaires que j'ai effectuées ont visé à ajuster la valence entre les odeurs OCT et MCH en faisant varier les concentrations lors du test (ordre de concentrations normal) dans le but de réduire un biais important vers l'une des odeurs, puis à tester les performances en groupe et en individuelles de MCT et MLT aversives, en les comparant avec les performances de mouches contrôles pseudo-conditionnées. Malheureusement, les résultats de ces expériences ne sont pas exploitables car nous nous sommes rendu compte qu'une fuite d'air au niveau de cet olfactomètre gênait l'expression de la réponse conditionnée. La suite de la mise au point a été principalement effectuée par Laure Kaiser, après colmatage de la fuite.

2.2.2 Performances de mémoires aversives à court- et long-terme en olfactomètre à 4 voies en fonction de la concentration des odeurs

Objectif

Déterminer quelles concentrations d'odeurs nous devons utiliser pour le conditionnement et pour le test afin d'obtenir les meilleures performances de MCT et de MLT en olfactomètre.

Protocole

Nous avons appliqué le conditionnement aversif en 1 cycle pour obtenir de la MCT et en 5 cycles pour obtenir de la MLT, en faisant varier les concentrations d'odeurs. Puis pour chaque situation, nous avons également fait varier les concentrations d'odeurs pour le test. Les mouches ont été testées en groupe, pour une durée de 2 min 30.

Résultats (Tableau 2)

La plupart des associations de concentration d'odeurs entre le conditionnement et le test ont permis d'obtenir de hauts scores de MCT et MLT aversives en olfactomètre à 4 voies. Ces résultats étaient très encourageants pour envisager ultérieurement l'utilisation plus intensive de cet appareillage dans le cadre des études de la mémoire aversive chez la drosophile.

Néanmoins, il était probable que des améliorations soient encore nécessaires pour la comparaison en olfactomètre des performances de mémoires appétitives et aversives, et le délai de mise au point ne paraissait plus convenable pour mener à bien l'ensemble du projet.

Dans un délai à plus court terme, nous avons donc décidé d'utiliser l'appareil de test en T, appareillage déjà bien connu et facile d'utilisation (non pour tester de l'attractivité mais une préférence entre deux odeurs), et avec les paramètres habituels du conditionnement aversif,

pour faire des premiers essais de conditionnement appétitif. Et finalement, ce fut un succès (et un heureux soulagement !).

		CONDITIONNEMENT AVERSIF		
		52µl OCT / 58µl MCH	58µl OCT / 58µl MCH	58µl OCT / 52µl MCH
TEST EN OLFACTOMETRE	52µl OCT / 58µl MCH	MCT = 65 ± 4 n=6	MLT = 51 ± 10 n=6	MCT = 32 MLT = 46 ± 11 ns=1 et 6
	58µl OCT / 58µl MCH		MLT = 48 ± 5 n=5	
	58µl OCT / 52µl MCH			MCT = 65 ± 3 MLT = 40 ± 10 ns=6
	52µl OCT / 52µl MCH	MCT = 72 ± 4 MLT 48h = 32 ± 4 ns=4		

Tableau 2: Scores de MCT et MLT aversives en fonction de la concentration des odeurs utilisées pour le conditionnement et pour le test en olfactomètre. La MCT est testée 1 à 2 h après un conditionnement aversif en 1 cycle, la MLT 24 h après un conditionnement aversif en 5 cycles, sauf pour une valeur indiquée où le test a été effectué à 48 h. Les valeurs représentent le score de position moyen ± l'erreur à la moyenne, suivi de l'effectif (n). Les cases vides sont des situations qui n'ont pas été testées.

2.3 Mise au point du conditionnement olfactif appétitif en groupe

Au début de notre projet, le seul dispositif existant (Fig. 3) pour les études de conditionnement appétitif en groupe (Tempel *et al.* 1983, Heisenberg *et al.* 1985, Schwaerzel *et al.* 2003) avait des limites: il fallait transférer les mouches dans différents compartiments pendant le conditionnement pour présenter les stimuli, et donc les mouches subissaient un choc mécanique au moment où on les retirait du sucre, ce qui pouvait perturber leur apprentissage associatif dans ce contexte de renforcement positif. Les performances de MCT étaient plutôt faibles (15 à 30) comparées à celles obtenues avec le paradigme de conditionnement aversif (70-80). De plus, les mouches avaient un problème de survie à jeun, et la MLT n'avait pas été étudiée depuis l'article de Tempel *et al.* (1983).

Il fallait donc concevoir un autre dispositif de conditionnement plus adapté et que l'on pourrait automatiser par la suite, et optimiser les paramètres de conditionnement et de test. Pour le test par exemple, la MCT était mesurée après 15 s à 1 min de test, ce qui était peut-être trop court, et les mouches étaient testées par groupe de 50 à 100, ce qui était sûrement trop.

2.3.1 Conception d'un nouvel appareillage de conditionnement appétitif

Nous avons opté pour la conception d'un barillet de conditionnement appétitif (Fig. 1 art.2), basé sur le barillet de conditionnement aversif (Fig. 12), mais comportant des logettes munies d'un cylindre en demi-lune tournant grâce à la gravité et qui permet de masquer la partie inférieure de la surface de la logette. Il est alors possible d'appliquer du sucre sur une moitié de la surface et de rendre cette surface disponible ou de la masquer pour les mouches en tournant le barillet. Cette manipulation se fait à la main, mais il sera possible de l'automatiser si l'avenir du dispositif est prometteur. Nous avons calqué le système du conditionnement aversif pour les connexions du barillet aux flux d'odeur et le mécanisme d'automatisation de l'arrivée des odeurs durant le conditionnement.

2.3.2 Choix des paramètres de conditionnement appétitif

- Stimulus appétitif inconditionnel

Comme stimulus appétitif inconditionnel, nous avons choisi une solution sucrée de saccharose à 0.5M, diluée dans de l'eau de source, par analogie avec le premier projet d'ECP. Plusieurs types de supports ont d'abord été testés, du papier à chromatographie (whatman, 0.33 mm d'épaisseur) à la feutrine. Mais cette méthode de présentation de la solution sucrée aux mouches engendrait trop de problèmes pour le maintien du stimulus au cours des conditionnements à plusieurs cycles: il fallait prendre en compte les facteurs d'évaporation (surface d'évaporation du papier, chaleur de la pièce, passage du flux d'air, etc...) et de désagrégation du papier, apparaissant au fur et à mesure du conditionnement à cause du faible maintien au niveau du tube (papier trop imbibé, frottements lors du masquage du sucre par la rotation du cylindre en demi-lune, etc...).

Nous avons finalement opté pour appliquer directement la solution sucrée sur la paroi du tube de conditionnement et la laisser sécher durant 24 à 48 h. Cette présentation du sucre était appétante pour les drosophiles, laissant penser qu'elles peuvent régurgiter de la salive pour diluer localement le sucre et l'ingurgiter.

- Stimuli olfactifs conditionnels

Deux odeurs à peu près de même valence pour la drosophile (en jouant sur les concentrations) sont nécessaires pour le conditionnement appétitif discriminatif. Nous avons opté pour garder les odeurs aversives du paradigme de conditionnement aversif (3-octanol et

4-méthylcyclohexanol) et aux mêmes concentrations (58 µl OCT / 52 µl MCH), comme cela avait déjà été fait par Tempel *et al.* (1983).

2.3.3 Protocole de conditionnement

Les mouches utilisées sont de la souche CS du laboratoire. Des groupes de mâles et femelles sont mis à jeun sur coton imbibé d'eau durant 22 h et sont âgés de 2 jours au moment du conditionnement.

Le protocole de conditionnement a été adapté à partir du modèle de conditionnement aversif. Chaque expérience commence donc par une émission d'air sans odeur pendant 1min30 pour habituer les mouches au flux.

Puis l'essai de conditionnement est réalisé ainsi:

5. de 1min 30s à 2min 30s : émission continue de l'odeur non-conditionnée sur 60 s
6. de 2min 30s à 3min 30s : émission d'air, pour éliminer la première odeur du dispositif.
7. de 3min 22s à 4min 22s : émission de la seconde odeur conditionnée, et retournement manuel lent (en environ 5s) du barillet de conditionnement pour présenter la face sucrée du tube aux mouches.
8. de 4min 22s à 5min 22s : émission d'air, pour éliminer la seconde odeur du dispositif, et retournement manuel lent (en encore environ 5s) du barillet de conditionnement pour le faire revenir dans sa position initiale et masquer la face sucrée du tube pour les mouches.

Comme pour le conditionnement aversif, les essais de conditionnement peuvent être répétés, soit sans période de repos entre les essais (5 cycles massés), soit avec 15 min de repos entre les essais (5 cycles espacés).

III. DELAI DE REALISATION DU DISPOSITIF DE CONDITIONNEMENT ET CONTRIBUTIONS DES DIFFERENTS PARTENAIRES A LA SUITE DU PROJET

Les acteurs de la conception du prototype du barillet de conditionnement appétitif sont Laure Kaiser, Thomas Preat, moi-même et Jean-Yves Tiercelin de l'atelier du CNRS pour la définition du prototype. La réalisation des pièces a été effectuée par une société spécialisée (Falcon SARL, 91400 Saclay) et le montage a été réalisé par l'atelier du CNRS pour limiter le coût de fabrication du prototype.

Il fallait compter un délai de 1 an de sa conception à sa réalisation et ses premières mises au point. Ce délai ne permettant pas un avancement correct de ma thèse, un troisième projet de thèse a été élaboré et planifié, réalisable durant cette année d'attente du prototype.

Finally, in view of the encouraging results of the third project, we chose to deepen this last one in the framework of my thesis, and Laure Kaiser became the main experimenter of this second project for the analyses of the performance of memory of the flies *CS*. My role on this second project was then limited essentially to the experimental assistance. It was thus proceeded to the verification of the learning in the flies *CS* by testing the MCT 1 to 2 h after a cycle of conditioning, then to the establishment of a retention curve up to 3 days of the performance of memory after the conditioning in 1 cycle, in 5 massed cycles and 5 spaced cycles. Then the work was continued at ESPCI by Julien Colomb, post-doctorant of the team of Thomas Preat, for the pharmacological and genetic characterization of the memory obtained at 24 h. The whole of these results is the subject of the publication that follows.

IV. ARTICLE N°2: LONG-TERM MEMORY FOR ODOR-SUGAR ASSOCIATION FORMS IN ONE TRAINING SESSION IN *DROSOPHILA*

The article n°2 « **Long-term memory for odor-sugar association forms in one training session in *Drosophila*** » that follows is under revision for the journal *Genes, Brain and Behavior*.

LONG-TERM MEMORY FOR ODOR-SUGAR ASSOCIATION FORMS IN ONE TRAINING SESSION IN *DROSOPHILA*

Laure Kaiser^{1,3,§*}, Julien Colomb^{2*}, Marie-Ange Chabaud^{1,2} and Thomas Preat^{2,4}

1. Développement Evolution et Plasticité du Système Nerveux, CNRS UPR 2197, Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

2. Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire, CNRS UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

3. INRA Centre de Versailles-Grignon ; UMR 1272 Physiologie de l'Insecte Signalisation et Communication, Route de St Cyr, 78026 Versailles Cedex, France.

4. Corresponding author: thomas.preat@espci.fr

§ Present address : IRD, UR 072, c/o Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

* the two authors contributed equally to this work.

Running title: LTM after one appetitive training session in *Drosophila*

Keywords:

Appetitive learning, motivation, memory dynamics, amnesiac, crammer, tequila, protein synthesis, conditioning

Abstract

Thirty years of research on *Drosophila* has led to the discovery of many behavioral, anatomical, cellular and molecular processes involved in learning and memory. In particular, these studies showed that distinct forms of memory are formed depending on learning procedures. While one session of conditioning triggers memories independent of protein synthesis, five spaced conditionings lead to the formation of long-term memory (LTM), a long-lasting memory dependent on *de novo* protein synthesis. Yet this work relies mostly on one faculty: remembering an odor previously associated to an electric shock. Can we extrapolate the identified processes to appetitive olfactory memory? The present study aims to generate and characterize LTM of an odor associated to sugar. We designed and tuned an apparatus allowing discriminative learning by alternate presentation of two odors (one being associated with sugar), without disturbing flies by transfer between two compartments. Our results show that both sugar responsiveness and short-term memory (STM) increased with starvation length before conditioning. As previously reported, the *rutabaga* mutant showed a short-term memory defect and a normal sugar response. A single or repeated conditioning sessions induced a memory still measurable after 3 days. The *crammer* and *tequila* mutants, which are deficient for aversive LTM, showed a sugar response defect, preventing us from measuring their potential appetitive LTM deficit. Using the cycloheximide drug, we demonstrated that the memory obtained at one day after a single or repeated conditioning sessions was dependent on *de novo* protein synthesis and thus corresponds to LTM.

INTRODUCTION

Few studies compared odor memories formed by association with negative versus positive unconditioned stimuli (US) and so far they all dealt with short-lasting memories, with the exception of Tempel *et al.* (1983). Analogies were established, like the requirement of mushroom body intrinsic neurons for acquisition (Schwärzel *et al.*, 2003) and short-term retrieval (Krashes *et al.*, 2007), as well as the involvement of *amnesiac* (*amn*) expressing neurons (Keene *et al.*, 2006). On the other hand, differences were also pointed out. It was shown that electric shock and sugar learning are mediated by dopaminergic and octopaminergic neurons, respectively (Schwärzel *et al.*, 2003), although a role of the dopaminergic system in appetitive learning was recently reported (Kim *et al.*, 2007b). The pioneer work of Tempel *et al.* (1983) revealed a slower memory decay in the case of sugar association. More recently, the antennal lobe was proposed to play an important role in appetitive but not aversive learning (Thum *et al.*, 2007).

The dynamics of appetitive learning remain unclear, while different forms of memory were identified using the electric shock paradigm. For instance, two exclusive forms of consolidated memory were described (Dudai, 2002, Isabel *et al.*, 2004, Tully *et al.*, 1994). A first form of memory, the so-called Anesthesia Resistant Memory (ARM), is produced after one session of conditioning or after a massed conditioning (several sessions repeated without time interval in between) and is independent on *de novo* protein synthesis (Tully *et al.*, 1994). Spacing the sessions leads to the formation of Long Term Memory (LTM) of which consolidation depends on protein synthesis (Mery & Kawecki, 2005, Tully *et al.*, 1994). Interestingly, differences in activated genes (Davis, 2005) and structural pathways (Pascual & Preat, 2001) have been found and may account for the exclusivity of the two consolidated memories (Isabel *et al.*, 2004).

In the case of odor-sugar learning, consolidated memories have been investigated in the honeybee but not in the fly. After a single trial consisting of a brief pairing of odor and sugar, honeybees form a memory of which consolidation does not depend on *de novo* protein synthesis or transcription, while the memory formed after repetitive conditioning (massed or spaced) does (Schwärzel & Müller, 2006). These findings raise the question of the specificity of consolidation mechanisms: are they specific to the species or to the US, or to both? The present study aims to generate and characterize long-lasting memory of an odor associated to appetitive sugar in *Drosophila*. We designed and tuned an apparatus for repeated synchronized exposure of flies to odor and sugar. It allows semi-automated conditioning of

several groups of flies simultaneously and avoids transferring flies from one compartment to another, which may alter the conditioning procedure. With this new tool, we investigated different properties of sugar-associated memory such as its dependences on satiation level and on the number and spacing of conditioning sessions. We then questioned the nature of the observed long-lasting memory, using genetic and pharmacological tools.

MATERIAL AND METHODS

Flies

Drosophila melanogaster, wild-type *Canton Special* (*Canton S*) and mutant flies were reared at 18°C on standard diet. For the experiments, 80-100 flies (1-2 day-old) were transferred to fresh diet for 24h at 18°C prior to starvation. *Crammer* (*cer^P*) and *tequila* (*teq^P*) lines, which were isolated in our laboratory, were outcrossed for 5 generations prior to be tested. *Amnesiac* (*amn¹*, *amn^{X8}*) and *rutabaga* (*rut²⁰⁸⁰*) mutant flies were obtained from S. Waddell and A. Thum, respectively.

Starvation

Prior to conditioning, groups of 40 flies were kept in plastic bottles (175 ml, Greiner Bio-one 960177) with a cotton wool (local store) imbibed with 6 ml of mineral water (Evian[®], pH=7.2) for 21h30±1h at 25°C. Except when the test was performed more than one day after conditioning, flies were starved in the same bottle after training. They were kept at 25°C if tested the day of the conditioning, or at 18°C if tested in a following day (one, three or seven). For the three-day tests, flies were transferred from starvation bottle into food bottle for two hours at 22h and 46h after conditioning. For the seven-day test, flies were starved for 22h after conditioning, then kept on food until day 6, then starved again for 22 h before tests began.

Conditioning apparatus

The conditioning apparatus (Fig. 1) was based on the barrel designed by Pascual & Preat (2001) for electric shock conditioning, where *Drosophila* are loaded into six compartments covered by electrifiable copper grid. The appetitive barrel has three compartments, in which we place three removable plastic tubes (internal diameter = 2.4 cm) covered with sugar on 2/5 of their surface (see below). In each compartment, a removable brass hemi cylinder masks the sugar when flies are loaded. The hemi cylinders are mounted on inox ball bearings. Therefore, when we rotate the barrel by 180°, the hemi cylinders stay in the inferior part of the tubes by the force of gravity and the sugar becomes accessible to the flies. Barrels are rotated as soon

as the conditioning odor is flowing through the barrel. Sugar intake is almost immediate, ensuring synchrony of odor-sugar presentation (90% flies pump the sugar within five seconds following rotation of the barrel). Computer-controlled electronic valves ensure fresh air and odor delivery at 2L/min flow rate.

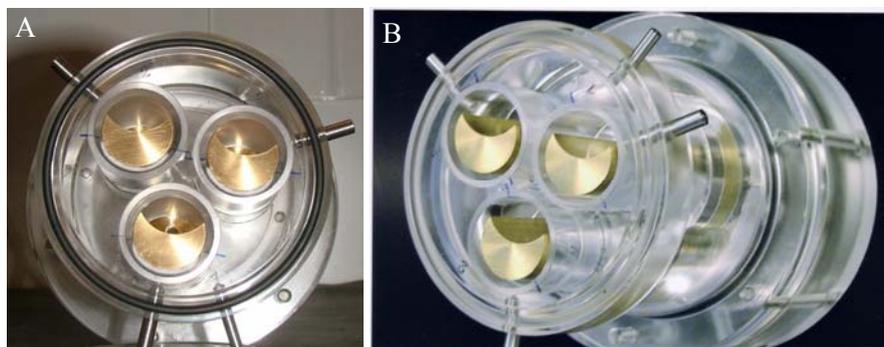


Figure 1. Barrel-type apparatus for odor-sugar associative conditioning. A. View of the barrel body and the lumen of the *Drosophila* tubes with the brass hemi cylinder. B. View of the closed barrel; arrows represent the airflow. A group of about 40 flies is introduced in a removable tube with dry sugar on the inferior 2/5 of the surface, masked by a brass hemi cylinder. A circular piece (not shown) equipped with a single opening is rotated to load each tube successively. After loading, the masterpiece is tapped and the lid is tightly secured. O-rings ensure air tightness. Odor delivery is ensured with computer-controlled electronic valves (Pascual & Preat, 2001). When the conditioned odor is delivered, the barrel is rotated by 180°, so the sugar part of the tubes becomes in the ceiling position and accessible to the flies.

Odor sources

3-octanol (>95% purity, Fluka 74878) and 4-methylcyclohexanol (99% purity, Fluka 66360) were diluted in paraffin oil (VWR international Prod. 24 679.360) at $3.6 \cdot 10^{-4}$ and $3.25 \cdot 10^{-4}$ respectively (Pascual & Preat, 2001).

Sugar delivery

A 1.5 M sucrose solution in mineral water (Evian®) was applied on 2/5 of the inner surface of plastic tubes, using a piece of imitation felt (2.7 x 4.5 cm, local store) imbibed with 1ml sugar solution (three tubes prepared with one felt). To let the sugar dry, tubes were left at room temperature for 24 or 48 hours before conditioning. The sugar tubes were replaced for each reciprocal experiment (see below) for massed and spaced conditionings but not for one-session conditioning.

Conditioning session

Conditioning and testing were performed at 25°C and 65-80% relative humidity.

After an initial period of 90 sec of non-odorized airflow, one session consisted of 60 sec of one of the odor, 52 sec of non-odorized airflow, 60 sec of the other odor, and 52 sec of non-odorized airflow. We rotated the barrels to allow for sugar association at the onset of odor delivery for one minute. We associated sugar to either the first or the second odor. As expected from a previous report (Kim *et al.*, 2007a), this had no effect on performance and data were pooled. In order to average out potential odor preference bias, one experiment consisted of two reciprocal conditionings with two groups of flies from the same rearing bottle, in which the order of the two odors was swapped. In the case of five massed conditioning sessions, there was no time lag between sessions. In the five spaced conditionings procedure, a 15 min period of non-odorized airflow lay between the end of a session and the beginning of the next one. For unpaired conditioning, sugar exposure was scheduled 7 min after the end of the session.

Tests

- Memory score: tests were performed with a T-maze apparatus (Tully & Quinn, 1985). Flies had to choose between two arms, delivering octanol versus methylcyclohexanol odor. After three minutes under red light condition, flies were trapped in either arm. A response index was equal to the difference of flies number between the two arms, divided by the sum of flies in both arms. Two indexes were calculated from two reciprocal experiments, and were averaged to give a memory score theoretically ranging from -1 to 1 (all flies in the conditioned odor for the two reciprocal conditionings), naive flies giving a zero score.

- Odor sensitivity: tests were performed with a T-maze apparatus. One odor was tested against its solvent (paraffin oil), for 3 minutes. The response index was calculated as above and used as a score. The odor was delivered alternatively through the right or left side of the maze. The index ranged theoretically from -1 (total repulsion) to 1 (total attraction).

- Sugar response: tests were performed with a T-maze apparatus. One arm covered with sugar was tested against one clean arm, in an odorless airflow. Flies were trapped in either arm after one minute. The sugar was placed alternatively on the right or left arm. The response index was calculated as above. We prepared the sugar arm as follows. A sucrose solution in mineral water (Evian[®]) was applied on a band in the inner surface of plastic test tubes, using a piece of imitation felt (0.5x6 cm) imbibed with 0.4 ml sugar solution (three tubes prepared with one felt). If not noted otherwise, we used a concentration of 0.15 M. For the sugar to dry, tubes were left at room temperature for 18-48h before tests. Each tube was used for 4 consecutive tests.

Cycloheximide (CXM) treatments

We modified a protocol from Yu *et al.* (2006). After one day on fresh diet, flies were put in 15ml Falcon tubes with a Whatman filter paper (1x2.5 cm) soaked with 125µl of 35mM CXM solution (94% purity, SIGMA c7698-1G) diluted in mineral water (Volvic[®], pH=7), or with mineral water alone (control), for 20h30. Flies were then transferred into regular starvation bottles for 30 min. before being conditioned, and put back in those bottles before being tested. In control experiments, the same protocol was used but flies were tested for their sugar responses instead of being conditioned, or conditioned and then tested for their sugar response or their odor sensitivity instead of for their memory.

Data analysis

Treatments effect on memory scores or response indexes to sugar or odors were analyzed using Student t-test to compare two groups, or one way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison if significant at $p < 0.05$, to compare several groups. When condition of homogeneous variances was not fulfilled, Kruskal-Wallis test was used (Zar, 1999). Because motivation for sugar supposedly increases with the length of starvation, this effect was tested under the 1-sided hypothesis, as well as the correlated effect on memory score. Scores indicated in text are given as mean \pm standard error of the mean.

RESULTS

Both appetitive memory and sugar response increase with starvation length

After being starved for 14 or 21 hours, flies were tested for their sugar response as well as for their memory (tested 1h30 after a one-session conditioning). We found that both measures increased with starvation time (Fig. 2). Interestingly, unstarved flies were not attracted to sugar (response index: -0.19 ± 0.08 , $n=30$) and showed no memory (1h30 memory score: -0.03 ± 0.04 , $n=15$).

Temporal pairing of odor and sugar leads to long-lasting memory

All memory scores tested from 1h30 to 22h after a one-session conditioning were above 30 % after odor-sugar pairing, whereas scores were close to 0 when the presentation of the odors and the sugar were unpaired (Fig. 3). The conditioned preference was thus generated by associative learning. After a single conditioning, the memory score decreased significantly from 1h30 to 6 h after conditioning, but not anymore between 6 and 22 h.

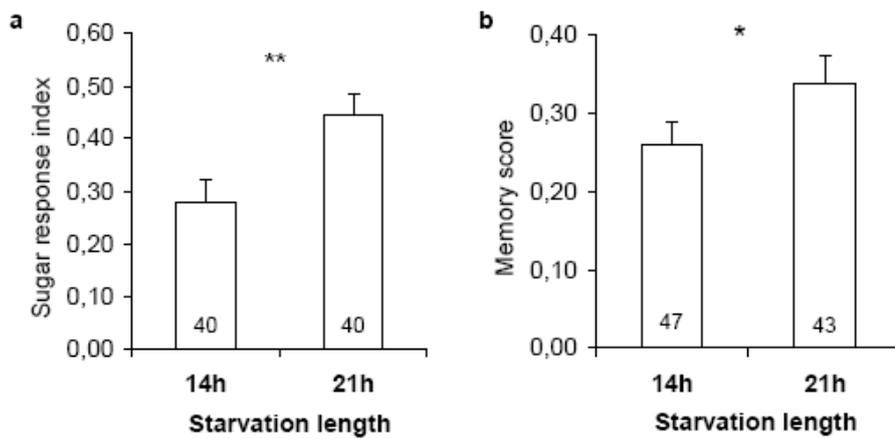


Figure 2. Sugar responsiveness and 1h30 memory score as a function of starvation length. Responsiveness to the sugar directly after starvation (a) and memory for the conditioned odors 1h30 after a 1-session conditioning (b) were tested in independent groups. See text for the calculation of memory score and response index to sugar. The graph displays mean values \pm SEM; sample sizes are indicated in the bars. Student t-test indicates a significant effect of starvation duration on memory score: *: $t = -1.68$, 82 df, $P_{\text{1sided}} < 0.05$; and on sugar response: **: $t = -2.68$, 159 df, $P_{\text{1sided}} < 0.01$.

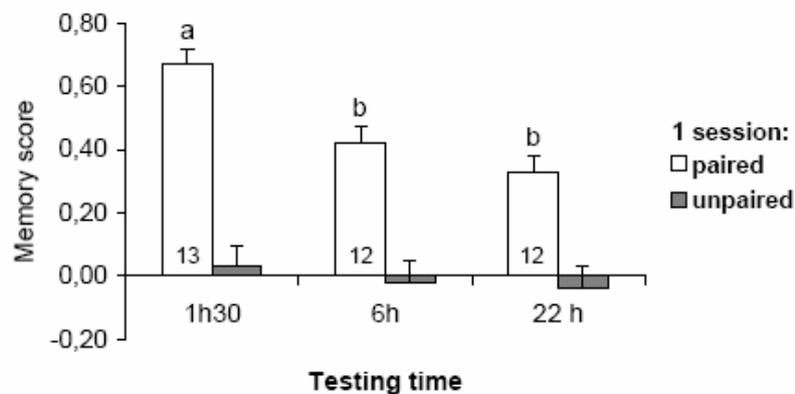


Figure 3. Associative learning, and time-course of memory within 24 h after a single conditioning session. Mean scores \pm SEM measured after one session of paired or unpaired conditioning, at increasing testing time. Memory was observed only after paired conditioning. ANOVA confirmed a significant memory decrease along time ($F_{2,34} = 12,47$; $P < 10^{-4}$), but not from 6 h on (Newman-Keuls statistic, letters indicate significant differences at $P < 0.05$). Sample sizes are indicated in the bars for paired groups and are equal to 9 for unpaired groups.

Long lasting memory is formed after single or multiple conditioning sessions

We next investigated the time-course of memory on a longer term, and after several conditioning sessions. One day (22 hours) after conditioning, all scores were similarly high regardless of the number and spacing of the conditioning sessions (Fig. 4). Three days after

conditioning, scores due to one or five massed sessions had decreased equally, and became lower than the memory score induced by five spaced sessions, which was unchanged compared to the score at one day. Seven days after conditioning, scores dropped. The score obtained with five spaced sessions was the only one still significantly higher than 0 (Student t-test: $t = 2.99$, 11 df; $P < 0.05$), but ANOVA failed to show a significant group effect. In all cases, mean mortality until the testing day was inferior to 5%.

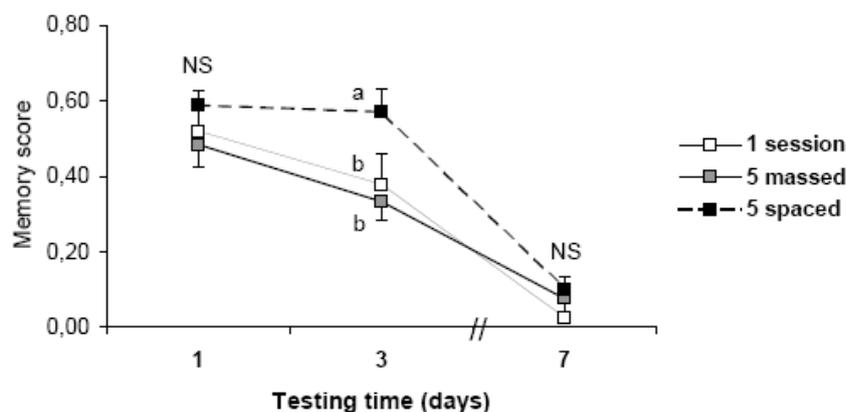


Figure 4. Time-course of memory over days, as a function of number and spacing of conditioning sessions. Mean memory scores and SEM compared after 1 or 5 (massed or spaced) conditioning sessions (respectively 1 session, 5 massed and 5 spaced), from 1 to 7 days after conditioning. Sample sizes: $n=11-12$. ANOVA showed a significant group effect on day 3: $F_{2,32} = 3,61$; $P=0,038$ (Newman-Keuls statistic, letters indicate significant differences at $P < 0.05$), but not on day 1 and 7 (NS at $P > 0.05$).

Genetic analysis of appetitive memory and sugar response

As previously shown with slightly different protocols (Thum *et al.*, 2007), *rut* flies showed normal sugar responsiveness (Table 1) but a defect in their memory score measured 1h30 after a one-session conditioning (see below). In parallel to that experiment, we investigated appetitive memory of *cer* flies, a mutant for long-term aversive memory (Comas *et al.*, 2004). Surprisingly, we found a defect in their STM score, too (*rut*²⁰⁸⁰: 0.18 ± 0.06 , $n=15$, *cer*^P: 0.21 ± 0.05 , $n=19$, *Canton S*: 0.38 ± 0.05 , $n=19$, ANOVA: $F_{2,50} = 4,12$; $P = 0.02$; Newman-Keuls at $P < 0.05$: *Canton S* > *rut* = *cer*). Also, *cer* flies showed a default in their sugar response (Table 1). We then tested the sugar response of other aversive memory mutants (*amn*, *dnc*, *teq*). Their scores were also lower than the corresponding *wild-type* controls (Table 1).

Interestingly, these defects in sugar responses are not observable while using a less sensitive test: using 1.5M sucrose solution instead of a 0.15M to prepare the sugar-coated arm of the T-maze (see *Material and Methods*), the response of *cer* and *teq* flies were undistinguishable from *Canton S* (*cer*: 0.48 ± 0.07 , $n=18$; *teq*: 0.44 ± 0.10 , $n=10$; *Canton S*: 0.56 ± 0.05 , $n=23$;

Kruskal-Wallis, $P > 0.05$). The abnormal sugar responsiveness of the mutants is probably masked at high sucrose concentration.

Genotype	Sugar response	Sample size
<i>Canton S</i>	$0,33 \pm 0,06$	22
<i>rut²⁰⁸⁰</i>	$0,34 \pm 0,04$	22
<i>Canton S</i>	$0,28 \pm 0,05$ (a)	51
<i>amn^{X8}</i>	$0,10 \pm 0,06$ (b)	30
<i>amn^l</i>	$0,04 \pm 0,05$ (b)	41
<i>dnc^l</i>	$-0,01 \pm 0,06$ (b)	24
<i>Canton S</i>	$0,48 \pm 0,04$ (a)	36
<i>cer^P</i>	$0,21 \pm 0,07$ (b)	24
<i>teq^P</i>	$0,26 \pm 0,06$ (b)	24

Table 1. Sugar responsiveness in *Canton S* and mutant flies. Mean \pm SEM of sugar response index compared in three independent experiments. Upper part, *Canton S* and *rut²⁰⁸⁰* have similar score ($t = 0.17$; 36 df; $P = 0.86$). Middle part: two different alleles of *amn* gene and the *dnc^l* mutant have lower scores than the corresponding *Canton S* group ($F_{3,142} = 5.73$; $P < 0.001$). Lower part: *cer^P* and *teq^P* flies also show a defect ($F_{2,81} = 6.73$; $P < 0.01$). Letters indicate a significant difference at $P < 0.05$ with the Newman-Keuls test following one-way ANOVA.

22 hours-memory is protein synthesis dependent after all conditioning procedures.

As long-term memory could not be assessed by a genetic approach, we used a pharmacological tool to investigate the role of *de novo* protein synthesis in the formation of the observed long-lasting memory. Treatment with cycloheximide (CXM), an inhibitor of protein synthesis administered for 20h30 and until 30 min. before conditioning, had no effect on the memory score tested shortly (1h30) after the one-session sugar conditioning (Fig.5A, $t=0.17$, 40 df, NS). However, when tested 22 hours after conditioning, the memory score was significantly lower in the CXM-treated groups, after one session as well as five sessions of appetitive conditioning, massed or spaced ($t \geq 2.88$, $df \geq 23$, $P < 0.008$). The drug had no effect on sugar responses neither at the conditioning time, nor at the retrieval time 22hrs after conditioning (Table 2). Similarly, the drug had no effect on olfactory responsiveness nor at the concentration used for conditioning, nor when diluted 5 times (Table 3). Surprisingly, starved flies showed more aversion toward the lower concentration of odors in our test, especially in the case of octanol. This result remains inexplicable at this point.

We next wanted to make sure that the observed deficit of memory was not due to a combined effect of CXM and starvation, which might have affected the retrieval of any form of olfactory memory at 22 hours. Unlike LTM, the aversive memory formed after massed conditioning does not depend on *de novo* protein synthesis (Mery & Kawecki, 2005, Tully *et al.*, 1994) and serves as a control in the aversive paradigm. We therefore looked at the memory formed after aversive massed conditioning of flies that had been prepared similarly as in the appetitive protocol and found no effect of CXM (Fig. 5B). This confirms that administration of CXM to starved flies specifically affects memory dependent on *de novo* protein synthesis, indicating that LTM is formed after a single appetitive training session.

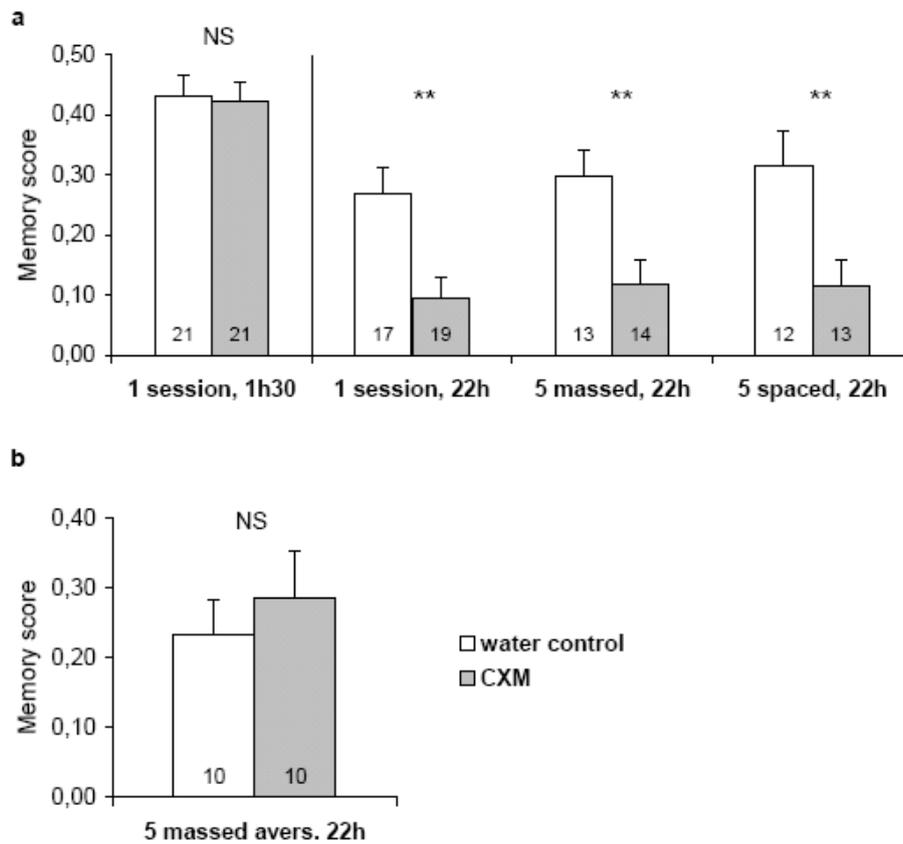


Figure 5. Effect of the protein-synthesis inhibitor on memory scores tested at short- and long-term depending on number and spacing of the conditioning sessions. A. Effect of the CXM drug on memory after different sugar-reward conditionings, tested at 1h30 (left) or 22 h (three bars on the right). B. Control with electroshock conditioning. CXM: cycloheximide, added to the water for 20h30 prior to conditioning. Graphs display means \pm SEM. Numbers in the bars are the sample sizes. Student t-test was used to compare memory scores between CXM-treated flies and control flies: NS for $P > 0.05$, ** for $P < 0.01$.

Sugar response	Water control	CXM 35 μ M	Student t-test
conditioning time	0.39 \pm 0.06 (27)	0.27 \pm 0.07 (27)	t = -1.27 ; P = 0.21
22 h post conditioning	0.61 \pm 0.04 (35)	0.54 \pm 0.04 (35)	t = -1.10 ; P = 0.27

Table 2. Control for sugar responsiveness after CXM treatment. Mean \pm SEM of response index to sugar. Sugar responsiveness was tested at a time corresponding to that of conditioning, i.e. 30 min after the end of the 20h30 treatment, or 22 h later, i.e. at time of test. There is no significant difference between water control and CXM-treated groups (Student t-test, $P > 0.05$). Numbers between brackets are the sample sizes.

Odor response	Water control	CXM 35 μ M	Student t-test
Methylcyclohexanol 1/1	-0.29 \pm 0.07 (16)	-0.27 \pm 0.07 (16)	t = -0.13 ; P = 0.90
Octanol 1/1	0.03 \pm 0.09 (25)	-0.02 \pm 0.08 (25)	t = -0.40 ; P = 0.69
Methylcyclohexanol 1/5	-0.64 \pm 0.07 (11)	-0.60 \pm 0.08 (11)	t = -0.40 ; P = 0.70
Octanol 1/5	-0.61 \pm 0.08 (9)	-0.67 \pm 0.06 (10)	t = 0.60 ; P = 0.56

Table 3. Control for odor responsiveness after CXM treatment. Mean \pm SEM of response index to the odors at time of test, at the concentration used for memory assays or diluted 5 times (1/5). There is no significant difference between water control and CXM-treated groups (Student t-test, $P > 0.05$). Numbers between brackets are the sample sizes.

DISCUSSION

Using a newly designed barrel for odor-sugar conditioning in *Drosophila*, we obtained high memory scores that lasted for hours following conditioning. The scores are comparable to those observed nowadays for electroshock conditioning (Pascual & Preat, 2001) and are due to associative learning, since unpaired exposure to odor and sugar yields null scores. An important progress brought by the present study is the ability to obtain significant memory retention over 24h and beyond, allowing investigation of long-lasting memory processes. This may have been favored by high initial learning, limited manipulation of flies during the conditioning and by the starvation protocol which kept flies vigorous, showing less than 5% mortality within three days after conditioning.

The present work also provides for the first time an effective and validated control for motivation in the study of appetitive memory in *Drosophila*. This is especially important

because learning scores following sugar associative conditioning were correlated to the feeding status of individuals both in *Drosophila* (Fig. 2, Tempel *et al.*, 1983) and in the honeybee, where this correlation was studied in more details (Friedrich *et al.*, 2004, Scheiner *et al.*, 2001, Scheiner *et al.*, 2005). Any apparent memory score defect (obtained with a pharmacological treatment or a genetic alteration) may thus be due to an effect on sugar responsiveness. Our test measures a difference in the sugar response of flies starved during different periods of time (which show different memory scores). Thus, this test effectively evaluates the motivational state of the flies. It allowed us to uncover deficiency in sugar motivation in a variety of memory mutant flies (Table 1), which could not be detected with less sensitive tests (present study, Keene *et al.*, 2006). For instance, the reported appetitive learning and memory phenotypes of *amn* and *dnc* might be linked to a defect in their sugar responsiveness (Table 1), which was previously overseen (Keene *et al.*, 2006, Milosevic, 1999, Tempel *et al.*, 1983). In addition, we can explain the unexpected defect of appetitive STM shown by *cer* mutants (which display only LTM defect in the case of aversive memory) with a deficiency in their sugar motivation (Table 1).

In the case of electroshock conditioning in the fly (Tully *et al.*, 1994), only the repetition of the conditioning trials lead to a memory depending on protein-synthesis. In contrast, we found that a single appetitive conditioning session (as well as massed and spaced conditioning sessions) leads to the formation of memory depending on protein synthesis. Indeed, oral administration of the protein synthesis inhibitor cycloheximide impairs memory at 22 h for all three conditioning protocols. On the other hand, this treatment does not affect the memory tested after two hours following one conditioning session, olfactory acuity, nor sugar responsiveness when tested at the time of conditioning or 22 hours after a conditioning session. In addition, the drug treatment has no effect on protein synthesis independent memory generated after an aversive massed conditioning of starved flies. We can thus exclude unspecific effects of CXM due to a prolonged protein deprivation at 22 hours. Hence, the drug has a specific effect on memory; all three training procedures induce a memory dependent on protein synthesis, defined as LTM.

Albeit generating similar learning levels, the three conditioning protocols are not equivalent, since memory scores tested three days after conditioning are higher after five spaced sessions. This evokes the situation in the honeybee, where scores obtained after massed PER conditioning are generally lower than after spaced ones, although memories formed after both procedures rely on *de novo* protein synthesis (Menzel *et al.*, 2001). Whether this difference is

quantitative or whether qualitatively different forms of LTM are formed still needs to be examined.

In our protocol, a single appetitive conditioning session induces LTM. On the contrary, in the case of proboscis extension reflex (PER) conditioning, five trials of five seconds of odor-sugar presentation in *Drosophila* (Chabaud *et al.*, 2006) and one trial of three seconds in the honeybee (Menzel, 2001) failed to induce LTM. This difference between the present experiments and the PER conditioning may be due to several variables: First, the strength of the US might have been heightened by the use of dried sugar instead of a solution. Second, the animals are immobilized in PER conditioning but not in our paradigm. This liberty of movement may have helped flies form stronger association between the odors and the sugar. Finally, the sugar presentation lasted one minute in the present protocol but only a few seconds in PER conditioning. Since repeated (massed or spaced) trials of PER conditioning can induce LTM in the honeybee (Menzel, 2001), we hypothesize that one session of conditioning in our protocol may correspond to an intensive PER conditioning. We indeed observed that most of the flies immobilized in few seconds on the sugared-area, pumping repeatedly with their proboscis during the whole minute of sugar presentation. The proposition that the intensity and prolongation of the US presentation is a key element to induce LTM is strengthened by a similar finding in a parasitic *Hymenoptera*, where LTM was shown to be formed after one conditioning session consisting of 3-4 minutes association between an odorant stimulus and a host-handling sequence ending by oviposition (Collatz *et al.*, 2006). In order to test this hypothesis, it would be interesting to reduce the duration of sugar presentation, or to decrease the sugar concentration.

At the molecular level, how can a single appetitive conditioning session induce LTM, although the parameters were chosen to be as close as possible to the one used in aversive conditioning? For LTM to form, repeated and spaced training sessions are thought to induce additive elevations of cAMP levels, causing a prolonged activation of the cAMP-dependent protein kinase A (PKA) which in turn phosphorylates the cAMP response element binding protein (CREB), a transcription factor which allows long-lasting modifications of synaptic connections (Silva *et al.*, 1998, Waddell & Quinn, 2001). Several findings suggest that a motivation driven elevation of PKA in the antennal lobe (AL) might be involved during appetitive learning. Firstly, artificially prolonged PKA activation in the honeybee AL combined with a single PER conditioning trial is sufficient to induce long-lasting memory (Müller, 2000); and PKA activation depends on starvation level, being high after 18h starvation, but low enough to impair LTM formation when bees are fed 4h prior to the

conditioning (Friedrich *et al.*, 2004). Moreover, PKA activation in the AL occurs through sugar-mediated octopamine signaling (Hildebrandt & Muller, 1995). Secondly, the AL and mushroom bodies are involved in appetitive learning and memory in *Drosophila* (Thum *et al.*, 2007), and octopamine neurons project to both brain regions (Sinakevitch & Strausfeld, 2006). Taken together, these results suggest that PKA activation in the antennal lobe neurons might facilitate the formation of motivation dependent appetitive LTM. Our new apparatus permits direct comparison between appetitive and aversive memory phases dynamics in *Drosophila* and may thus become of great help in order to test these hypotheses.

Acknowledgements

The authors are grateful to Jean-Yves Tiercelin for contributing to design, realize and set up the sugar barrel prototype, to Patrick Para for his help in the maintenance of the apparatus and to Jean Paul Bouillot for the pictures. They thank Philippe Vernier and Gérard Baux for their interest and general support during the experiments at the INAF, Elsa Bonnard for her help with setting up experiments, Guillaume Isabel and Frédéric Mery for helpful discussions, and Michel Chaminade for his logistic help during the experiments.

This work was supported by the Swiss National Fund (grant for young researcher PBFRA-116951, to J.C.), by the Paris 13 University, Ecole Doctorale Sciences du Vivant et Société (to M.A.C.), and by grants from the Agence Nationale pour la Recherche, the Fondation Bettencourt-Schueller and the Fondation pour la Recherche Médicale (to T.P.).

Chabaud, M.A., Devaud, J.M., Pham-Delegue, M.H., Preat, T. & Kaiser, L. (2006) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **192**, 1335-1348.

Collatz, J., Muller, C. & Steidle, J.L. (2006) Protein synthesis-dependent long-term memory induced by one single associative training trial in the parasitic wasp *Lariophagus distinguendus*. *Learn Mem*, **13**, 263-266.

Comas, D., Petit, F. & Preat, T. (2004) *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature*, **430**, 460-463.

Davis, R.L. (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci*, **28**, 275-302.

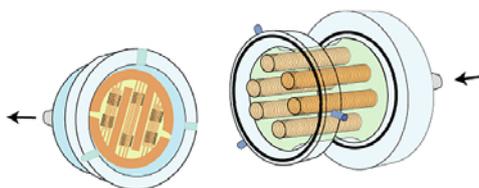
Dudai, Y. (2002) Molecular bases of long-term memories: a question of persistence. *Curr Opin Neurobiol*, **12**, 211-216.

- Friedrich, A., Thomas, U. & Muller, U. (2004) Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J Neurosci*, **24**, 4460-4468.
- Hildebrandt, H. & Muller, U. (1995) Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol*, **27**, 44-50.
- Isabel, G., Pascual, A. & Preat, T. (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science*, **304**, 1024-1027.
- 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. *Curr Biol*, **16**, 1524-1530.
- Kim, Y.C., Lee, H.G. & Han, K.A. (2007a) Classical reward conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Genes Brain Behav*, **6**, 201-207.
- Kim, Y.C., Lee, H.G. & Han, K.A. (2007b) D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J Neurosci*, **27**, 7640-7647.
- Krashes, M.J., Keene, A.C., Leung, B., Armstrong, J.D. & Waddell, S. (2007) Sequential use of mushroom body neuron subsets during *drosophila* odor memory processing. *Neuron*, **53**, 103-115.
- Menzel, R. (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn Mem*, **8**, 53-62.
- Menzel, R., Manz, G. & Greggers, U. (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Mem*, **8**, 198-208.
- Mery, F. & Kawecki, T.J. (2005) A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science*, **308**, 1148.
- Milosevic, N.J. (1999) [Effect of dunce and amnesiac genes on signal learning in *Drosophila melanogaster*: experiments with odors]. *Genetika*, **35**, 209-215.
- Müller, U. (2000) Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron*, **27**, 159-168.
- Pascual, A. & Preat, T. (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science*, **294**, 1115-1117.
- Scheiner, R., Page, R.E., Jr. & Erber, J. (2001) The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem*, **76**, 138-150.
- Scheiner, R., Schnitt, S. & Erber, J. (2005) The functions of antennal mechanoreceptors and antennal joints in tactile discrimination of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **191**, 857-864.

- Schwärzel, 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*. *J Neurosci*, **23**, 10495-10502.
- Schwärzel, M. & Muller, U. (2006) Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell Mol Life Sci*.
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W. & Kida, S. (1998) CREB and memory. *Annu Rev Neurosci*, **21**, 127-148.
- Sinakevitch, I. & Strausfeld, N.J. (2006) Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol*, **494**, 460-475.
- Tempel, B.L., Bonini, N., Dawson, D.R. & Quinn, W.G. (1983) Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *PNAS*, **80**, 1482-1486.
- Thum, A.S., Jenett, A., Ito, K., Heisenberg, M. & Tanimoto, H. (2007) Multiple memory traces for olfactory reward learning in *Drosophila*. *J Neurosci*, **27**, 11132-11138.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S.C. & Del Vecchio, M. (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell*, **79**, 35-47.
- Tully, T. & Quinn, W.G. (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]*, **157**, 263-277.
- Waddell, S. & Quinn, W.G. (2001) Flies, genes, and learning. *Annu Rev Neurosci*, **24**, 1283-1309.
- Yu, D., Akalal, D.B. & Davis, R.L. (2006) *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron*, **52**, 845-855.
- Zar, J. (1999) *Biostatistical analysis.*, Prentice Hall International.

PROJET N° 3

PERFORMANCES INDIVIDUELLES ET COLLECTIVES DE MEMOIRE OLFACTIVE AVERSIVE CHEZ LA DROSOPHILE



PERFORMANCES INDIVIDUELLES ET COLLECTIVES DE MEMOIRE OLFACTIVE AVERSIVE CHEZ LA DROSOPHILE

I. RESUME DE L'ETUDE

Le protocole de conditionnement classique olfactif aversif est le plus utilisé pour les études épigénétiques de la mémoire chez la drosophile, par la robustesse, la facilité et la rapidité des investigations. Cependant, les performances de mémoire sont mesurées sur des groupes de mouches et une question fondamentale est de savoir si ces performances sont bien représentatives des performances individuelles.

Pour répondre à cette question, nous avons appliqué le paradigme de conditionnement olfactif aversif et comparé les performances individuelles et collectives en testant les mouches soit de manière individuelle soit en groupe, et ce pour les deux types de mémoires consolidées, la MLT et la MRA. Nous avons pu établir que ces mémoires consolidées ne reflètent pas toujours les performances individuelles de mémoire, car durant le test les interactions entre les mouches influencent l'expression de la réponse conditionnée. Après un conditionnement espacé, les mouches ont tendance à présenter une meilleure performance de MLT en situation de test individuel. En situation de test collectif avec la MLT, les mouches sont probablement gênées par la présence rapprochée de leur congénère. Au contraire, après un conditionnement massé, les mouches présentent une meilleure performance de MRA en groupe. Nous avons réalisé un ensemble d'expériences pour élucider le mécanisme. Cet effet positif du groupe n'est pas lié au contexte social de l'apprentissage, puisque qu'il apparait également après un conditionnement individuel. Il n'est pas lié non plus à un phénomène d'agrégation non-spécifique vers le côté où il y a le plus de mouches. Ce phénomène nécessite la présence de la mémoire, car nous avons montré que seules les mouches conditionnées produisent les interactions à l'origine de l'effet du groupe et seules les mouches conditionnées y sont sensibles. Cela suggère que l'effet positif du groupe en MRA implique une facilitation sociale du rappel individuel de la mémoire. Ce travail fait l'objet d'un article en révision pour re-soumission au journal *Current Biology*.

Le test de la MRA en groupe montre que l'effet positif du groupe est progressif au cours du test, avec une augmentation significative du score entre 1 et 2 ou 3 min. Nous nous sommes basés sur cette latence du score en groupe, plus rapide à expérimenter que la différence entre le score individuel et le score de groupe, pour rechercher les différents facteurs et mécanismes potentiels de l'effet groupe, tels que les interactions sexuelles, la vision, la production de sons par les ailes, la communication à distance, et l'attractivité ou la répulsion entre les mouches.

Cette recherche, présentée ici en expériences complémentaires, a soulevé quelques pistes intéressantes qui pourront être investies par le laboratoire de T. Preat après ma thèse.

Nous avons ensuite réalisé une analyse descriptive des performances individuelles pour la MMT, la MLT et la MRA, notamment par une analyse de l'évolution des performances au cours du test et à leur comparaison avec celles d'individus contrôles pseudo-conditionnés et par des analyses de la locomotion et de l'activité exploratoire. Premièrement, nous avons vérifié que les performances de MMT en groupe reflètent bien les performances individuelles de mémoire, sûrement en conséquence d'un effet plafond. Avec la MMT et la MLT, l'aversion conditionnée est immédiate dès le début du test. Avec la MLT, la réponse conditionnée paraît plus robuste qu'avec la MMT et la MRA car les mouches font un choix dynamique de la bonne odeur au cours du test. Avec la MRA, la réponse conditionnée n'est pas immédiate au début du test, et l'effet du premier choix est accentué par un phénomène d'habituation aux odeurs plus précoce au cours du test que pour la MLT. Ce travail fait l'objet d'un article en préparation pour soumission à *Journal of Experimental Biology*.

II. PHASE DE MISE AU POINT: ADAPTATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES AU TEST INDIVIDUEL

2.1 Choix de l'appareil de test

Dans la perspective d'observer par vidéo le comportement des mouches pendant le test, nous avons d'abord voulu utiliser l'olfactomètre à 4 voies (Fig. 14). Les premiers essais infructueux (voir paragraphe 2.2.1, projet n°2) nous ont conduits à utiliser l'appareil de test en T pour la suite de ce troisième projet. Finalement, nous n'avons pas opté non plus pour l'enregistrement vidéo, car les conditions lumineuses et la définition de l'image (surtout avec l'appareil de test en T) étaient insuffisantes pour le matériel vidéo disponible au laboratoire. L'utilisation de la machine de test en T permettait du moins que les données en groupe tiennent lieu de référence dans leur comparaison avec les données individuelles. Pour cela, il a été également nécessaire de polir la logette d'une machine de test pour y observer les mouches par transparence. Nous avons ensuite vérifié que l'utilisation de la machine de test polie n'avait pas d'effets significatifs sur les performances de MCT à 1 h des mouches en groupe par rapport à une seconde non polie (Pas de fig.; scores = 64 ± 5 et 68 ± 4 ; T-test: $P = 0.82$; $N_s=8$).

2.2 Adaptation de la luminosité à l'observation des mouvements des mouches

Pour observer individuellement les mouches, il a été d'abord nécessaire d'augmenter la luminosité par rapport aux conditions habituelles de test au laboratoire: le faible éclairage

produit par l'ampoule rouge au plafond a été remplacé par un éclairage sur table lumineuse (Waldmann, 50Hz). La lumière est homogène sur toute la surface de la table. Pour diffuser de la lumière rouge et à l'intensité minimum nécessaire pour observer les mouches dans l'appareil de test, nous l'avons recouverte de plusieurs couches de papier plastique transparent rouge. Nous avons ensuite vérifié que l'utilisation de la table lumineuse n'avait pas d'effets significatifs sur les performances de MLT à 24 h des mouches en groupe par rapport à un éclairage habituel sous ampoule rouge.

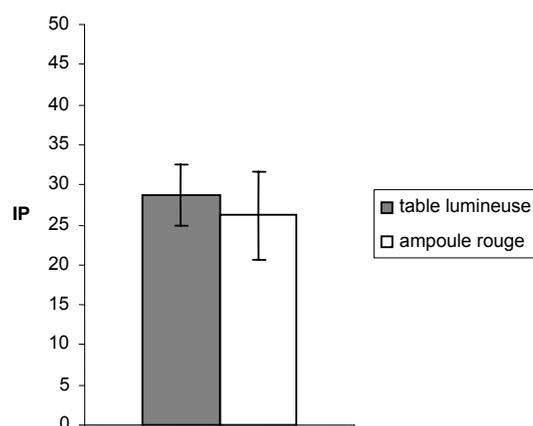


Figure 22: Scores de MLT à 24 heures en groupe, en fonction de l'éclairage utilisé: éclairage habituel (ampoule rouge) ou éclairage sur table lumineuse. (N = 10-11, T-test : $P = 0.71$).

Les scores obtenus avec et sans table lumineuse n'étaient pas différents (Fig. 22), mais trop faibles pour ce qu'on attend habituellement des scores de MLT testés 24h après conditionnement, c'est-à-dire une performance moyenne au moins égale à 35.

Cette expérience faisait l'objet de mes premiers essais d'expérimentation de la mémoire à long terme en conditionnement aversif. J'ai appris progressivement à maîtriser l'ensemble des paramètres nécessaires au bon fonctionnement du protocole. Plus tard, dans le cadre d'une autre analyse, j'ai comparé la performance de MRA des mouches sur table lumineuse et dans le noir complet, et les performances étaient également similaires (Fig. 25; $t < 0.60$, $P > 0.55$, 12 ddl).

2.3 Choix des paramètres à observer pendant le test individuel

Des essais expérimentaux préliminaires nous ont permis d'estimer les comportements potentiellement intéressants à enregistrer pendant l'observation en individuel et d'évaluer la durée nécessaire à l'observation. Afin de recueillir un maximum d'informations, nous avons choisi d'observer les mouches jusqu'à 3 min de test.

Lors des observations individuelles, l'enregistrement des différents comportements et paramètres a été effectué à l'aide du programme Observer (version 3.0 puis 5.0, Noldus). Ce

programme nous a permis de gagner un temps précieux en effectuant un certain nombre d'analyses de manière automatique.

Les principaux paramètres analysés sont :

- le temps passé par la mouche dans les différentes zones de l'appareil de test ou la position de la mouche à des temps fixes, dans le but de mesurer des scores relatifs à la performance de mémoire (voir paragraphe suivant),
- le comportement exploratoire, par la quantification en nombre et durée des passages entre les deux odeurs et la logette,
- le comportement locomoteur, par la mesure des temps de marche et arrêts au cours du test et en fonction de l'odeur traversée.

Pour analyser plus finement le comportement exploratoire, nous avons divisé virtuellement l'appareil de test en 5 zones: la logette au centre, et deux zones pour chaque tube d'odeur, nommées zones proximales et zones distales en fonction de leurs positions par rapport à la logette (Figure 23). Ces zones, de longueurs non-homogènes, ont été déterminées en fonction des discontinuités de l'épaisseur de l'appareillage autour des tubes, rendant plus opaque la zone proximale que la zone distale.

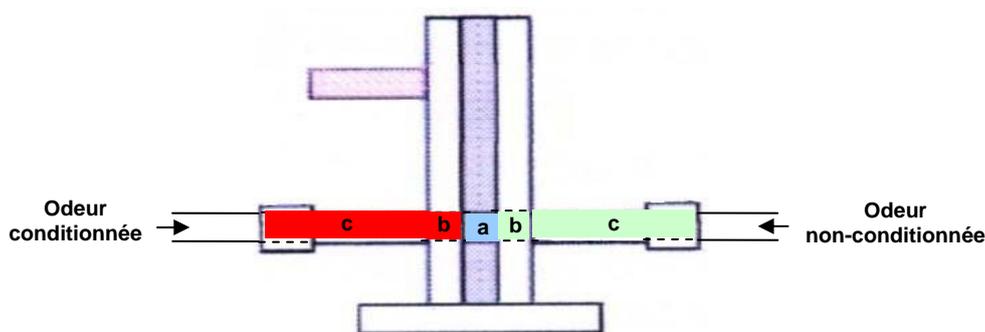


Figure 23: Représentation schématique de la machine de test en T. Les mouches sont transférées via la logette coulissante au niveau du point de choix (a, bleu) où convergent les flux des deux odeurs conditionnée et non-conditionnées par aspiration au niveau de la logette. Pour l'analyse de l'activité exploratoire individuelle, les tubes par où circulent les odeurs sont divisés virtuellement en deux zones en fonction de leur opacité à la lumière: (b) les zones proximales de 2 cm de long et (c) les zones distales de 7.5 cm de long.

D'autres comportements ont été observés initialement, comme les $\frac{1}{2}$ tours à l'entrée des zones et les sursauts, mais ils n'étaient pas assez bien caractérisés pour les prendre en compte dans

l'analyse. A partir des données recueillies, plusieurs autres analyses ont pu être effectuées, comme l'analyse en fonction du sexe et en fonction de la première odeur traversée.

Nous avons utilisé deux méthodes principales pour le calcul du score individuel de mémoire:

L'analyse de durée consiste à mesurer un score pour chaque individu par un indice de performance de durée, défini par le temps passé dans l'odeur non-conditionnée moins le temps passé dans l'odeur conditionnée, le tout divisé par le temps total passé dans les deux odeurs. Cette analyse a été utilisée pour étudier la distribution des scores individuels au bout des 3 min de test. Cependant, elle ne permet pas de visualiser l'évolution du score individuel au cours du test, car elles utilisent des durées cumulées qui nous empêcheraient de voir ce qui se passe réellement à un temps donné.

L'analyse de position a été utilisée pour mesurer l'évolution du score au cours du test, et pour obtenir un score comparable statistiquement à celui du groupe. Elle consiste à noter la position de la mouche à différents temps du test. Les données obtenues sont de type binaire: la mouche se trouve soit dans la bonne odeur soit dans la mauvaise (on ne prend pas en compte les mouches présentes dans la logette⁴³). Pour un échantillon d'individus donné, le score individuel global est obtenu par le calcul d'un indice de performance (IP), défini par le nombre de mouches présentes dans la bonne odeur moins le nombre de mouches présentes dans la mauvaise odeur, le tout divisé par le nombre total de mouches présentes dans les deux odeurs. Pour obtenir un score individuel moyen, similaire et comparable à celui du groupe, nous avons recréé artificiellement des lots de mouches dans l'analyse. Nous avons choisi d'effectuer cet échantillonnage par ordre d'expérience, et non en prélevant au hasard des individus au sein des données: les individus sont groupés par lot de 6 pour chaque expérience inverse, et un IP est calculé pour chacun des lots (similaire aux ip des lots appariés pour le test en groupe). Puis les indices des lots appariés dans les deux expériences inverses sont moyennés, pour obtenir un IP moyen (similaire à l'IP du test en groupe). Cette méthode d'analyse avait déjà été utilisée dans l'étude individuelle de la MCT dans le paradigme de l'évitement passif (Phelan *et al.* 1998).

⁴³ La logette constituant une zone de passage entre les deux odeurs conditionnée et non-conditionnée, nous considérons que les mouches présentes peuvent être en train de transiter vers l'une ou l'autre odeur. La présence dans la logette n'est pas prise en compte dans le calcul des scores de mémoire. Cependant, il faut noter que les mouches conditionnées et contrôles testées individuellement y passent une partie non négligeable du temps du test (15 à 26 %) et que 10 à 14 % des mouches testées en groupe s'y trouvent à la fin du test.

2.4 Méthode de comparaison des performances individuelles et en groupe

Pour homogénéiser les conditions de test en individuel et en groupe, les mouches sont prélevées à partir des mêmes bouteilles: pour chaque bouteille, 2 mouches (1 mâle et 1 femelle) sont testées individuellement, puis le reste des mouches est testé en groupe.

Le test en groupe, réalisé initialement seulement au bout de 1 min comme valeur de référence, est finalement réalisé à 1 min, 2 min et 3 min pour la comparaison avec le score individuel moyen (position). Le score de groupe, comme le score individuel, ne prend pas en compte les mouches présentes dans la logette à la fin du test. Dans le cadre de l'analyse comparative, nous avons choisi d'enregistrer ce paramètre au cas où.

De même, il était inhabituel de noter le sex-ratio des échantillons d'individus testés en groupe. Nous avons choisi de le comptabiliser après le test, au moment du calcul du score de groupe. En séparant les sexes dans l'analyse, nous pouvions alors analyser le score des mâles et des femelles au sein du groupe.

III. ARTICLES N°3 et N°4

L'article n° 3 « **Social Facilitation of Long-Lasting Memory Retrieval in *Drosophila*** » a été soumis au journal *Current Biology* au mois de juin 2008 et est maintenant en cours de révision pour re-soumission. Il correspond à une partie de mon travail de mise en évidence et d'analyse de l'effet positif du groupe sur les performances de MRA.

L'article n°4 « **Characterisation of Individual Olfactory Memory Performances in *Drosophila melanogaster*** » est en cours de préparation pour soumission à *Journal of Experimental Biology*. Il correspond à mon travail d'analyse de la réponse conditionnée sur les mouches individuelles.

Social Facilitation of Long-Lasting Memory Retrieval in *Drosophila*

Marie-Ange Chabaud^{1,2*}, Guillaume Isabel^{1*}, Laure Kaiser^{2,3} and Thomas Preat¹

¹Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire, CNRS UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

²Développement, Evolution et Plasticité du Système Nerveux, CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

³Present address : IRD, UR 072, Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, UPR 9034, CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

Contact

Correspondence should be addressed to T.P. (thomas.preat@espci.fr).

Additional footnotes

* These authors contributed equally to the work.

Running title

Social Facilitation of Memory Retrieval.

Summary

Social sharing of information is an advantageous solution used by a wide range of species, in which animals adapt their behaviour to the environment by extracting knowledge from siblings [1-3]. A recent study shows that this phenomenon is not restricted to vertebrates or colonial insects, as the wood cricket uses social information to adapt its predator-avoidance behaviour [4]. In the gregarious fly *Drosophila melanogaster*, social interactions can influence future individual behaviours [5, 6] and rhythms [7, 8], and social experiences can be memorised [9, 10]. Nevertheless, olfactory memory performance has often been investigated using groups, with little consideration for potential fly interactions during memory retrieval. Two forms of long-lasting associative memory are known in *Drosophila*, long-term memory (LTM), which depends on *de novo* protein synthesis, and another, anaesthesia-resistant memory (ARM), which does not [11, 12]. LTM and ARM form under distinct situations and are exclusive [12]. Here we show that these two memories lead to different behavioural responses. ARM is a cooperative form of memory, as ARM-trained flies interact within a group to improve their performance during memory retrieval. In contrast, LTM is improved when tested in individual flies rather than in a group. The two forms of long-lasting memory have therefore evolved opposite social characteristics.

Results and Discussion

How do social interactions interfere with memory? In *Drosophila*, does the memory performance of a group reflect individual performances, or do interactions take place within a group, in particular during memory retrieval? We studied the influence of group interactions on ARM and LTM performance by comparing individual and group scores. We first trained flies in groups to associate an odour with an electric shock [13]. Two protocols were used that correspond either to five training trials without rest interval to produce ARM (massed conditioning), or to five training trials separated by 15 min rest intervals to produce LTM (spaced conditioning). The test was performed in a T-maze [14] where flies could choose between two odours, one being the previously conditioned odour expected to be avoided. Flies were tested either individually or in groups.

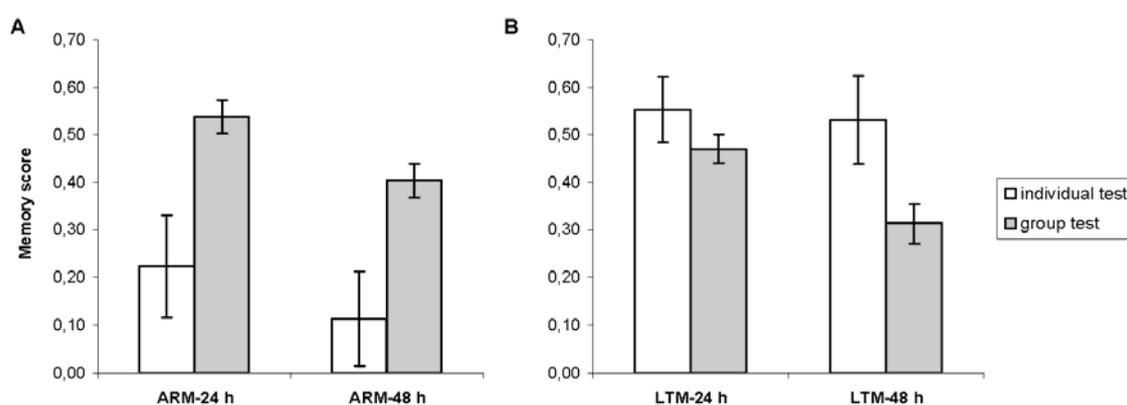


Figure 1: ARM is a cooperative memory and LTM a strong individual memory in *Drosophila*.

A, 24 h and 48 h olfactory memory induced by the massed conditioning protocol (ARM) of groups of flies, tested on individual flies ($n = 120$) or on groups of flies ($n = 10-15$). Individual flies scores were pooled in 10 groups for comparison with groups data. Data represent mean \pm standard error of memory score. Fly interactions in a group have a positive effect on ARM retrieval (two-way ANOVA test, significant sociality factor: $P = 5.9 \cdot 10^{-5}$) similar at both 24 h and 48 h tests (non significant time factor: $P = 0.089$ and non significant time*sociality interaction: $P = 0.86$). Individual scores at 48 h are not different from zero (t -test, $P > 0.20$). **B**, 24 h and 48 h olfactory memory induced by the spaced conditioning protocol (LTM) of groups of flies, tested on individual flies ($n = 100-120$ individuals) or on groups of flies ($n = 10-18$). Individual flies scores were pooled in 8-10 groups for comparison with group data. Data represent mean \pm standard error of memory score. There is no positive group effect on LTM retrieval, as LTM performance is higher in individual flies than in groups (two-way ANOVA test, significant sociality factor: $P = 0.029$) at both 24 h and 48 h tests (non significant time factor: $P = 0.079$; non significant time*sociality interaction: $P = 0.24$).

In the case of ARM (Figure 1A), the score of the group outstripped the level of individual scores at 24 h. This positive group effect on ARM retrieval persisted 48 h after training, as group performances remained high whereas individual scores were not different from zero (Figure 1A). Being in a group therefore restored the conditioned response of odour avoidance, which was no longer expressed in individuals at 48 h. A similar positive group effect was not observed in the case of LTM (Figure 1B). On the contrary, flies trained with spaced conditioning showed higher scores when tested individually rather than in a group. The positive group effect is therefore ARM-specific and does not reflect a general arousal of memory retrieval. ARM and LTM are known to be exclusive forms of long-lasting memory [12]. The present work further supports the view that LTM but not ARM is present after spaced conditioning, since the social effect is seen only after massed conditioning (which produces ARM but not LTM).

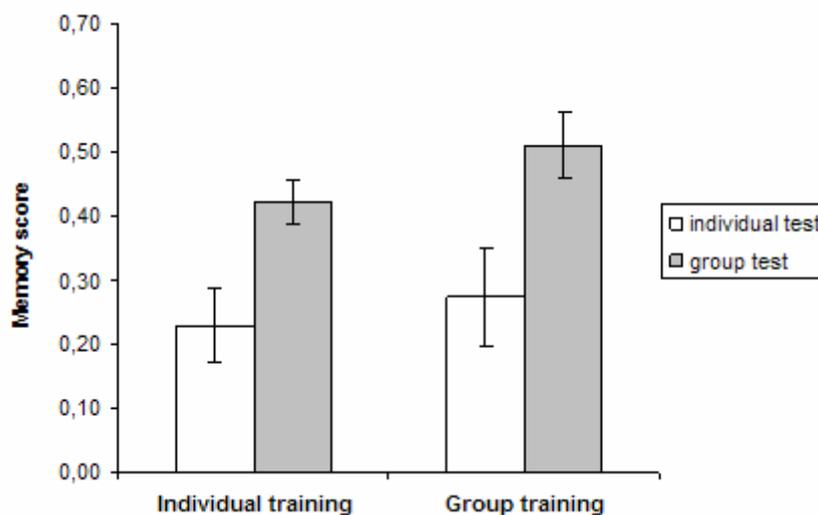


Figure 2: The positive group effect observed in ARM-trained flies is not due to learning context.

24 h memory scores of ARM, measured on individual flies ($n = 120$ individuals) or on groups of flies ($n = 10$). Flies were either trained in groups or trained individually and gathered after training. Individual fly scores were pooled in 10 groups for comparison with group data. Data represent mean \pm standard error of memory score. The positive group effect on ARM performance occurred similarly after individual or group training, indicating that it is independent of the learning context (two-way ANOVA, test context factor: $P = 0.0005$; learning context factor: $P = 0.25$; test*learning interaction: $P = 0.73$).

In this first experiment, ARM-trained flies were conditioned in a group, and so it was plausible that the higher memory score displayed by flies tested in group was due to similar social setting during training and testing. We hypothesized that ARM might be more sensitive to the test context and supported less generalization than LTM. Therefore, we searched for potential context effects occurring during massed conditioning by comparing individual and

group training. Flies trained individually with the massed protocol and tested in a group showed an increased ARM performance compared to flies trained and tested individually (Figure 2). The positive effect of group testing was similar to that observed with flies trained in a group (Figure 2). Thus the group enhancement of ARM performance is not due to learning context. Rather it involves social interactions during memory retrieval.

Two main hypotheses may explain the social effect that takes place during ARM retrieval. In the first hypothesis, the social phenomenon is not directly related to memory. During the test, ARM-trained flies would tend to aggregate in the tube where flies are the most abundant. In the second hypothesis, the social phenomenon is directly linked to memory, and corresponds to group interactions that facilitate memory retrieval. To validate one of these hypotheses, we tested mixed groups containing both flies conditioned to one odour for ARM and flies conditioned to the other odour for LTM (Figure 3). If the first hypothesis is valid, flies trained for ARM are expected to follow flies trained for LTM during the test (Figure 3C). In contrast, the second hypothesis predicts that flies trained for ARM or LTM will avoid their respective conditioned odour preferentially, without interfering with the other group (Figure 3D). Interestingly, ARM-trained flies tested in a group continued to avoid their conditioned odour independently of the presence of LTM-trained flies (Figure 3E). Thus, the positive group effect on ARM performance was not due to unspecific aggregation, but involved social facilitation of ARM retrieval.

Which types of interactions are at the origin of this social facilitation within the ARM group? In particular, are these interactions specific to trained flies or does the simple fact of being in a group facilitate ARM retrieval? In this latter case, an ARM-trained fly tested in a group of naïve flies would have a higher memory score than if tested alone. We showed that this is not the case (Figure 4A). ARM retrieval seems to be facilitated only in the presence of other trained flies, suggesting the existence of interactions within ARM-trained flies that do not exist in naïve flies. As a complementary experiment, we tested whether ARM-trained flies could inform naïve flies and orientate them toward the right odorant during testing. When mixed with a group of ARM-trained flies, a group of naïve flies displayed a null memory score (Figure 4B), showing that the group effect produced by ARM-trained flies acts only on trained flies. This suggests that the positive group effect involves specifically social facilitation of ARM retrieval.

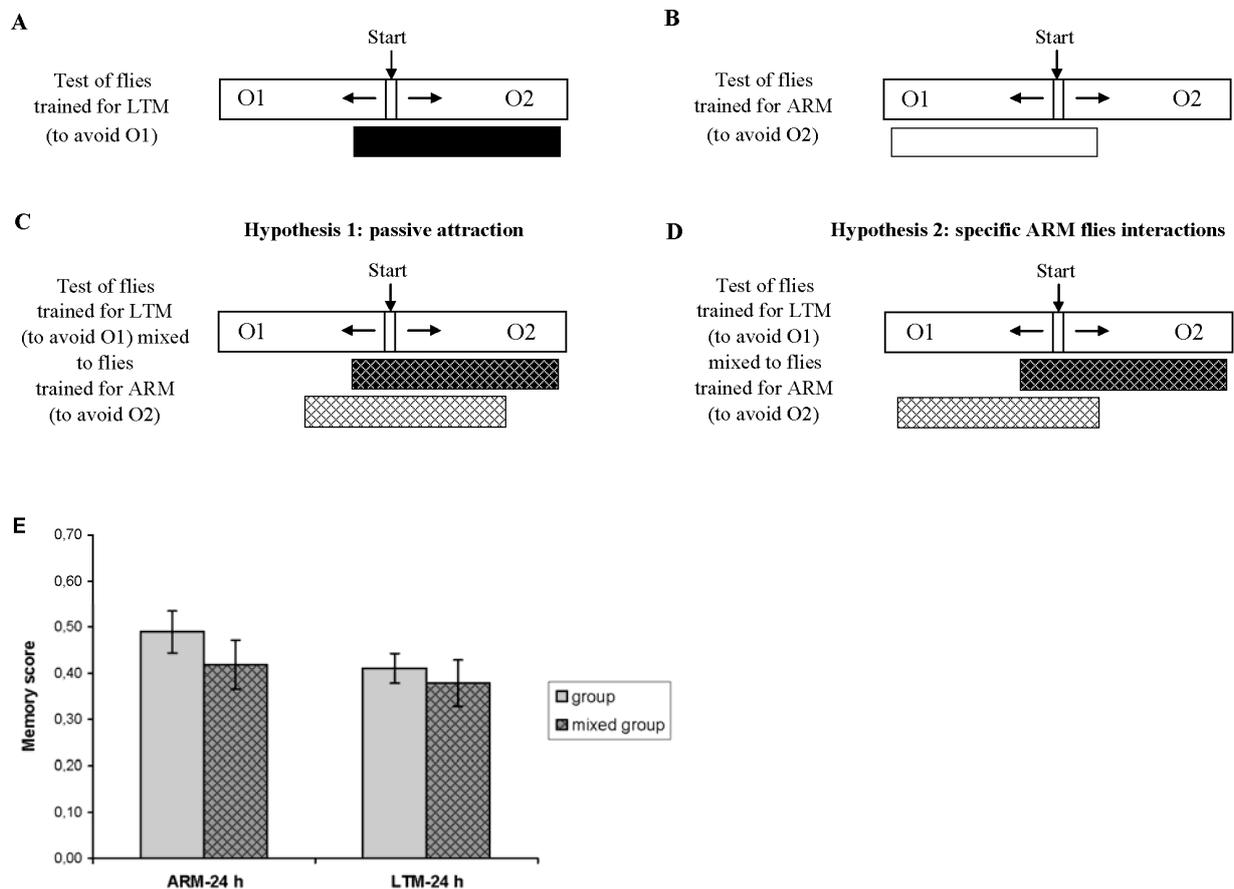


Figure 3: The positive group effect observed in ARM-trained flies is not due to non-specific aggregation. **A**, Schematic showing the distribution of flies in a T-maze when testing a group trained to avoid odour 1 (O1) with the spaced conditioning protocol (LTM). Flies start the test in the centre compartment and distribute in the side tubes containing each odour. **B**, Schematic showing the distribution of flies in a T-maze when testing a group trained to avoid odour 2 (O2) with the massed conditioning protocol (ARM). **C**, Schematic of the expected distribution of flies when testing mixed groups, if the positive group effect is due to passive aggregation of ARM-trained flies. ARM-trained flies tend to follow LTM-trained flies and therefore will yield a poor memory score. **D**, Schematic of the expected distribution of flies when testing mixed groups if the positive group effect involves social facilitation of memory retrieval. ARM-trained flies choose the correct odour independently of the presence of LTM-trained flies. **E**, Observed 24 h memory scores of ARM and LTM when both groups are mixed at testing ($n = 13$ mixed groups) compared with scores of non-mixed groups of ARM ($n = 16$ groups) and LTM-trained flies ($n = 11$ groups). Data represent mean \pm standard error of memory score. Scores of ARM and LTM-trained flies were not influenced by the mixing, as shown by the absence of significant difference with non-mixed control groups (two-tailed t -test; $P > 0.34$ for ARM and $P > 0.61$ for LTM), supporting the model presented in D. We verified that ARM-trained flies tested in groups showed a higher 24 h score than the flies tested individually ($n = 128$ individuals and $n = 16$ groups. Individual scores = 0.28 ± 0.5 versus group scores = 0.49 ± 0.5 , two-tailed t -test with Dunn-Sidak correction, $P = 0.005$).

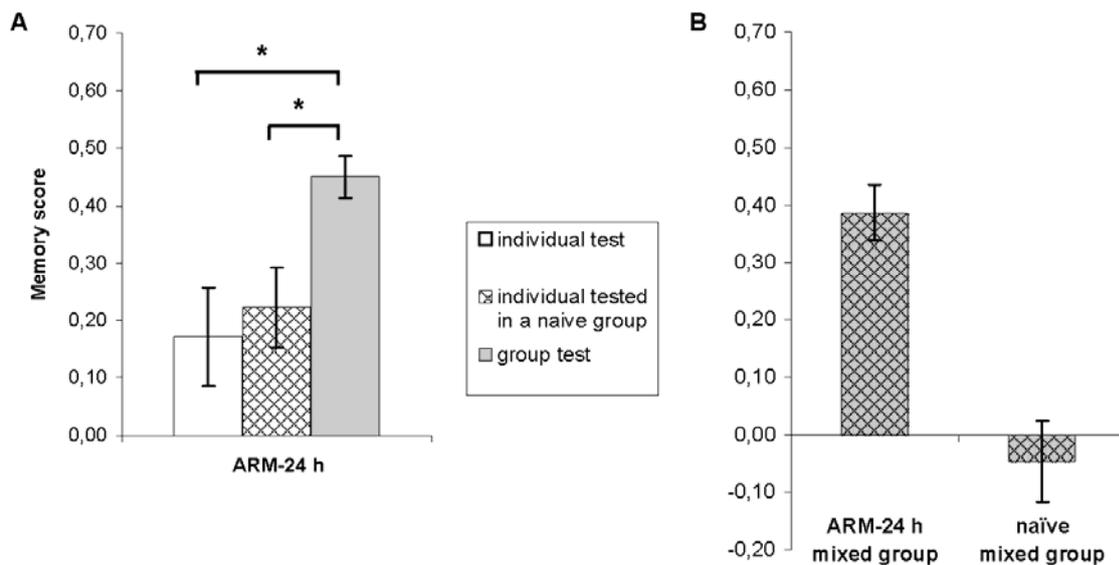


Figure 4: Social facilitation of memory retrieval involves specific interactions occurring among trained flies. **A**, Observed 24 h memory scores after massed training (ARM), measured in individual flies ($n = 96$ individuals), in individual flies tested among groups of naïve flies ($n = 96$ individuals), or in groups of flies ($n = 16$). We checked that groups of naïve flies have a score not different from zero when an ARM-trained fly is mixed with the group (t -test, $P > 0.81$, $n = 40$). Data represent mean \pm standard error of memory score. ARM-trained flies tested alone in a naïve group showed a similarly poor score as ARM-trained flies tested individually (t -test, $P > 0.67$), and both showed a significantly lower score than ARM-trained flies tested in a group (t -test, respectively $P < 0.020$ and $P < 0.019$). This indicates that the simple fact of being in a group is not sufficient to produce the social facilitation of ARM retrieval, and that specific interactions among trained flies are necessary. **B**, Observed 24 h memory scores after massed training (ARM), and scores of naïve flies when both groups are mixed at testing ($n = 10$ mixed groups). Naïve flies were not attracted by ARM-trained flies as their scores remained not different from zero (t -test, $P > 0.55$), suggesting that social facilitation requires memory. Stars indicate significant effect at a p-value inferior to 0.05 (*).

Former studies using the passive avoidance paradigm, a precursor of the classical conditioning protocol used here, did not find differences between short-term memory performances tested individually and in groups [15]. Our work complements these studies by showing that long-lasting memory performances displayed by groups outstrip performances of individuals after massed conditioning, while they are slightly lower than performances of individuals after spaced conditioning. We show that the poor ARM performance in individuals does not reflect an erasing of memory, but a deficit of memory retrieval occurring in solitary flies. This deficit is restored by social interactions among ARM-trained flies. The molecular and cellular mechanisms at play remain to be determined. The interactions occurring within ARM-trained flies may involve any of the signalling modalities that

Drosophila uses for communication (visual, auditory, tactile and/or chemical), and we have not yet addressed this question.

LTM is known to be more stable than ARM [11], but with a higher fitness cost [16]. Our results on individual behaviour do reflect a higher stability of LTM. However, we also show that group interactions allow ARM to reach scores similar to that of LTM at 24 and 48 h. Thus, in ARM-trained flies, social interactions seem to bypass the need for good individual memory. ARM would be a case of social learning in the broad sense, well studied in other animal species [2, 17, 18]. High levels of ARM are formed after massed conditioning, i.e. after a period of high frequency stimulus presentation. Thus, in the wild, it is conceivable that ARM has evolved as a memory involved in situations where flies are more likely to be grouped [19]. On the contrary LTM is linked to learning situations interspaced in time, and is therefore more likely to be specific to each individual. This dichotomy of ARM and LTM holds clues about the evolution of sociality [3], and opens a range of questions about group interactions in *Drosophila* memory studies.

Experimental Procedures

Conditioning procedure

Drosophila melanogaster wild-type strain Canton-Special was raised at 18°C and trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described [13]. Conditioning was performed on samples of 30-40 flies aged between 2 and 3 days. In the case of individual conditioning, flies were trained individually and gathered just after training in samples of 35 flies.

Memory test

Memory tests were performed under red neon light at 25°C and 80 % relative humidity. For individual memory tests, single flies were collected without anaesthesia from groups just before the test, and introduced alone in the T-maze [14] to choose between octanol or methylcyclohexanol odour over a 3 min period. At the end of the test period the presence of the fly in one odour compartment or the other was taken into account. To compare the memory score of individuals and groups, we first pooled 12 consecutive individual results (6 flies conditioned with each odour) to calculate a memory score similar in essence to that of a group score [13]. A mean individual memory score and its standard error were then calculated from 8-10 pools.

For group memory tests, flies were tested in the T-maze apparatus for 3 min. A mean group memory score and its standard error were then calculated from 10-18 groups. A memory score represents the normalized probability of a correct choice.

In the case of the tests with mixed groups, we had to differentiate between two populations of flies. In the experiment with mixed ARM and LTM-trained flies, we marked flies used for LTM conditioning by clipping the tips of their wings under brief (20 seconds) CO₂ anaesthesia, 24 h before training. The two groups of about 30 flies were trained for ARM and LTM with opposite odours, and mixed just before testing. We calculated independently LTM and ARM scores with respect to their conditioned odour. In that experiment, the control group of LTM-trained flies alone also consisted of clipped-wing animals. In the experiment with mixed groups of naïve and ARM-trained flies, we marked flies of both groups alternately by clipping the wing as indicated. Approximately 12 naïve flies were mixed in the group of about 30 ARM-trained flies just after conditioning. In the experiment with single ARM-trained flies mixed with a group of about 30 naïve flies, we used a *w¹¹¹⁸*; Gal4 strain with orange eyes to distinguish the naïve flies. We calculated scores similarly and independently for naïve flies and trained flies.

Statistical analyses

Mean scores of figures 1 and 2 were analysed with two-way ANOVA including calculation of the interaction between both considered factors (GLM procedure of the software “R”). The individual 48 h ARM score of figure 1 and the score of naïve flies of figure 4 were tested for significance using a *t*-test for single mean against zero [20]. Mean scores of figures 3 and 4 were compared with two-tailed *t*-tests. For all statistical analyses we used the significance level $\alpha = 0.05$, except for figure 4 where the significance level $\alpha = 0.025$ after application of the Dunn-Sidak correction for the use of data in two comparisons [20].

References

1. Sumpter, D.J. (2006). The principles of collective animal behaviour. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361, 5-22.
2. Chittka, L., and Leadbeater, E. (2005). Social learning: public information in insects. *Curr. Biol.* 21, 869-871.
3. Couzin, I. (2007). Collective minds. *Nature* 445, 715.
4. Coolen, I., Dangles, O., and Casas, J. (2005). Social learning in noncolonial insects? *Curr. Biol.* 15, 1931-1935.
5. Connoly, K. (1968). The social facilitation of preening behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 16, 385-391.

6. Kamyshev, N.G., Smirnova, G.P., Kamysheva, E.A., Nikiforov, O.N., Parafenyuk, I.V., and Ponomarenko, V.V. (2002). Plasticity of social behavior in *Drosophila*. *Neurosci. Behav. Physiol.* 32, 401-408.
7. Levine, J.D., Funes, P., Dowse, H.B., and Hall, J.C. (2002). Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 2010-2012.
8. Fujii, S., Krishnan, P., Hardin, P., and Amrein, H. (2007). Nocturnal male sex drive in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 244-251.
9. Ganguly-Fitzgerald, I., Donlea, J., and Shaw, P.J. (2006). Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science* 313, 1776-1781.
10. Yurkovic, A., Wang, O., Basu, A.C., and Kravitz, E.A. (2006). Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 103, 17519-17524.
11. Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.
12. Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024-1027.
13. Pascual, A., and Preat, T. (2001). Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294, 1115-1117.
14. Tully, T., and Quinn, W.G. (1985). Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 157, 263-277.
15. Phelan, L.L., Rodd, Z., Byers, D., and Rosellini, R.A. (1998) Odor passive avoidance learning in *Drosophila melanogaster*: parametric investigations of unconditioning stimulus intensity and inter-trial-interval. *Learn. Motiv.* 29, 83-101.
16. Mery, F., and Kawecki, T. J. (2005). A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 308, 1148.
17. Galef, B.G., and Laland, K.N. (2005). Social learning in animals: empirical studies and theoretical models. *Bioscience* 55, 489-499.
18. Langridge, E.A., Franks, N.R., and Sendova-Franks, A.B. (2004). Improvement in collective performance with experience in ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 56, 523-529.
19. Tinette, S., Zhang, L., and Robichon, A. (2004). Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior. *Genes Brain Behav.* 3, 39-50.
20. Zar, Z.H. (1999). *Biostatistical Analysis*, Fourth Edition, (Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall).

Acknowledgements

We thank Yadin Dudai and members of our laboratory for helpful discussions, and Antoine Branca for help with “R”. This work was supported by the Agence Nationale pour la

Recherche, the Fondation Bettencourt-Schueller and the Fondation pour la Recherche Médicale (to T.P.). M.-A.C. was supported by the Ministry of Research. G.I. was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale.

Competing interests statement: the authors declare no competing financial interests.

Characterisation of Individual Olfactory Memory Performances in *Drosophila melanogaster*

Marie-Ange Chabaud^{1,2}, Laure Kaiser^{2,3} and Thomas Preat¹

¹Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire, CNRS UMR 7637, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

²Développement, Evolution et Plasticité du Système Nerveux, CNRS, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

³Present address : Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation, équipe IRD UR 072, 1 avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France.

Abstract

As memory performance is accessible mainly through retrieval, an indispensable approach to study memories is to describe precisely the conditioned response. We used the olfactory aversive conditioning in *Drosophila* to observe and analyse the individual conditioned response of odour avoidance, after short, massed and spaced conditioning procedures. We show clearly distinct characteristics of memory performances after massed and spaced procedures, with immediate and dynamic choices during the test after the spaced procedure, whereas ARM-trained flies made a delayed conditioned choice and, as MTM-trained flies, seemed more subject to habituation during the test. This study also confirmed the existence of a positive effect of group for ARM-trained flies, which would reduce the latency of their conditioned choice and their fast habituation to the conditioned odour. This work helps to understand how flies use their different memory types to adapt their odour choice, and suggests that distinct memories are expressed 24h after massed and spaced procedures.

Keywords

Aversive conditioning, Memory, Retrieval, Individual behaviour, Group performances

Abbreviations

MTM Middle term memory

LTM Long term memory

ARM Anaesthesia resistant memory

Introduction

Investigations of memory aim to understand how individuals adapt their decision making and their behaviour to an environmental circumstance, in function of their previous experiences. Memory is a three-step process: acquisition of memory, memory storage and memory retrieval. The respective contribution of these steps on memory performance are hard to separate even in controlled laboratory studies, because memory performance is accessible mainly through retrieval, measured by the expression of the conditioned behaviour. Consequently, an indispensable approach to study memories is to describe precisely the conditioned response.

In *Drosophila*, olfactory aversive conditioning has been thoroughly studied for more than 30 years. Pavlovian and discriminatory version of the paradigm consists in the presentation of an odour associated with electric shocks and another not (Tully *et al.*, 1985). This pavlovian protocol is based on an instrumental odour passive avoidance conditioning (Quinn *et al.*, 1974). Memory performance is measured on groups of flies in a T-maze, in which flies are allowed to choose between both odours for a given time. At the end of the test, a mean performance index is calculated by counting the flies that made the correct and the wrong answer. This paradigm provides a relatively easy and rapid assessment of learning and memory capacities, allowing screening for mutants (for review, see Waddell and Quinn 2001). It induces different forms of memories: labile short-term and middle term memory (STM and MTM), and two forms of consolidated memory which can be obtained by repetition of the learning trials (Tully *et al.* 1994; Isabel *et al.*, 2004). The long-term memory (LTM), formed after spaced repetitions, was known to be more stable than the anaesthesia-resistant memory (ARM), formed after massed repetitions (Tully *et al.* 1994), and LTM formation required *de novo* protein-synthesis contrary to ARM (Tully *et al.*, 1994). Two models have been proposed to explain the relationship between LTM and ARM. In the first one, both memories coexist after spaced conditioning (Tully *et al.* 1994). In the second model, ARM and LTM are exclusive (Isabel *et al.* 2004).

However, important features of the dynamics of memory phases have been revealed using measurements on groups of flies, and the olfactory conditioned response has never been precisely characterized, neither on groups nor on individual flies. Furthermore, results obtained from group performances must be interpreted with some caution, because we cannot be certain that individual responses and behaviours are not biased by interactions among flies, as notified elsewhere (Devaud 2003). Previous studies using the passive avoidance paradigm have demonstrated the appropriateness of the use of the group conditioning paradigm for certain domains of study: Wallace and Sperlich (1988) demonstrated that during the avoidance conditioning in group, each fly are exposed to the conditioning when the procedure

employed a sufficient number of electric shocks; the results of Quinn *et al.* (1974) suggested that the expression of learning during the test is probabilistic in every flies, and thus that the performance measured in group is representative of that of each individual member of the group; Phelan *et al.* (1998) finally reported odour passive avoidance learning in individual flies. However, we recently demonstrated with the classical paradigm of olfactory aversive conditioning that for long-lasting memories, group performances do not always reflect individual performances and can be influenced by interactions between flies during the test (Chabaud *et al.*, submitted). Interestingly, this effect is memory specific. ARM retrieval is facilitated when flies are tested in group, and at contrary LTM performance is higher when tested individually. In order to understand the difference between ARM and LTM retrieval in individuals, it is thus necessary to characterize individual conditioned responses.

In the present study, we used the olfactory aversive conditioning in *Drosophila* to observe and analyse the individual conditioned response of odour avoidance, for both types of long-lasting memory ARM and LTM, and for MTM. For each memory type, we measured several behavioural items potentially related with memory retrieval, such as the time passed in each odour, the locomotion and rest states and the exploratory activity between and within odours, and we analysed the evolution of the conditioned response during the test. This study helped determining which behavioural features sustain the difference of scores between ARM and LTM-trained flies, as we showed in particular that, tested individually, LTM-trained flies made dynamic choices of the correct odour from the beginning and several times during the test, whereas ARM-trained flies made a delayed-choice and for a shorter time than LTM-trained flies.

Material and methods

Biological material

The subjects used were adult *Drosophila melanogaster* from the wild-type strain *Canton-Special*. Flies were raised at 18°C on standard *Drosophila* medium, then trained and tested under red light at 25°C and at 80 % relative humidity.

Olfactory classical conditioning

Discriminatory olfactory aversive conditioning was performed on samples of 30-40 flies aged between 2 and 3 days. One conditioning trial consists to pair electrical shocks (twelve 1.2 s pulses of 60 V electrical shock over 1 min) with a first odour, followed by presentation of the second odour without electrical shocks. 4-methylcyclohexanol and 3-octanol were used alternatively as conditioned stimulus (Tully and Quinn, 1985; Pascual and Preat 2001). Flies

trained with this paired procedure were compared with control flies, trained with an unpaired procedure consisting in delivering electrical shocks 2 min before the first odour. With this schedule, flies cannot learn any association between electrical shocks and odours (Tanimoto *et al.*, 2004).

Memory that we measured 1h30 after one conditioning trial (short protocol) corresponds both to middle-term memory (MTM) and anaesthesia resistant memory (ARM) (Tully *et al.* 1990). Flies trained with the short protocol were compared to specific control flies, trained with one trial of the unpaired procedure.

The massed protocol consists in five consecutive trials, without inter-trial interval. ARM that is detected after massed conditioning was measured 24 h after training (Tully *et al.* 1994). Flies trained with the massed protocol were compared with control flies trained with five repetitions of the “unpaired” procedure without inter-trial interval.

The spaced protocol consists in five consecutive trials, with 15 min inter-trial intervals. Memory that we measured 24 h after training was thought originally to be composite, with the induction of both ARM and long-term memory (LTM) (Tully *et al.* 1994). However we showed that ARM is not observed after spaced conditioning (Isabel *et al.* 2004). Flies trained with the spaced protocol were compared with control flies, trained with similar repetitions of the unpaired procedure.

Memory test

For individual memory assays, single flies were collected without anaesthesia from trained groups, and introduced alone in a T-maze apparatus (Tully and Quinn, 1985) to choose between octanol or methylcyclohexanol odour during 3 min. 6 flies per group were tested individually. The remaining flies of a group (about 30) were then tested in group in the T-maze for 1 min, 2 min or 3 min to verify the positive effect of the group on ARM scores (Chabaud *et al.*, submitted). Tests were performed under a red light sufficient to observe flies in the T-Maze.

Data recording

Data were recorded with the software Observer 5.0 ([®]Noldus). We registered the position of flies in the different parts of the T-maze, *i.e.* the arm carrying the “correct” (non-conditioned) odour, the central part where flies are introduced and the arm carrying the “incorrect” (conditioned) odour. We also noted their position within each arm, divided in two virtual zones, the short proximal zone corresponding to the junction with the central part of the T-maze, and the longer distal zone corresponding to the remaining volume of the arm. Locomotion and rest states were also registered.

The individual memory performance was estimated in two ways. First we measured a “duration score” for each fly, which consists in the difference between the time spent in the correct and the incorrect odours, divided by the time spent in both odours. A mean individual duration score and its standard error were then calculated after each conditioning protocol. Second, the evolution of odour choice along the test was analysed using the position of the fly at increasing times (at the first choice, 30 s, 1 min, 2 min and 3 min). We calculated a “position score” on pooled individual data as the difference between the number of flies in the correct odour and the incorrect odour, divided by the total number of flies in both odours.

To verify the positive effect of the group on ARM scores, we had to compare the memory score of individuals and groups. We pooled thus 12 consecutive individual position results (6 flies conditioned to each odour) to reconstitute a memory score similar in essence to that of a group score, as described elsewhere (Phelan *et al.* 1998; Chabaud *et al.* submitted). A mean individual position score and its standard error were then calculated from pools.

In all cases, a memory score represents the normalized probability of a correct choice, multiplied by 100. Thus scores are evaluated on a scale from -100 to 100.

Statistical analyses

The median test (z) was used to characterize the symmetry of the distribution of duration scores around the median for control flies (Table 1). The chi-square test (χ^2) was used to compare the distributions of duration scores of trained flies with those of control flies (Table 1), to compare position scores (Figs. 2 and 3) and to compare the distribution of flies in function of their number of odour changes (Fig. 4). Haber correction (χ^2_{Haber}) was applied for 1 df chi-square test (Zar, 1999). Mean scores were compared with a two-tailed t-test (t) (Figs. 1, 5 and Tables 2, 3 and 4). The time spent in pause *vs* locomotion (Table 3) and in the distal *vs* proximal zones (Table 4) in each odour were compared with a t-test for paired data (t_{paired}). Mean latency of the first choice was analysed with two-way ANOVA (F). Results of all statistical analyses referred to the significance level $\alpha = 0.05$, except when a given data sample was used in several comparisons. In this case, we used the significance level $\alpha = 0.025$ after application of the Dunn-Sidak correction for the use of data in two comparisons (Zar, 1999).

Results

Mean individual memory performance

For all control unpaired procedures, duration scores were not significantly different from 0, indicating that unpaired training induced neither avoidance nor preference for any odours

(Fig. 1; $t < 1.12$, $P > 0.20$, 87 df). Control individual scores were however not normally distributed and showed bipolar and symmetrical distributions around the means (Table 1; median test: $z < 1.96$, $P > 0.23$, 1 df). Thus control individuals chose randomly one of both odours, then tend to remain in this odour for most of the test.

All the associative training procedures induced a significant individual avoidance of the conditioned odour compared to corresponding control procedures (Fig. 1; $t > 2.42$, $P < 0.016$, 202 df), with similar memory performances for males and females (No fig.; $MTM_{\sigma} = 65 \pm 9$ and $MTM_{\varphi} = 62 \pm 9$, $LTM_{\sigma} = 39 \pm 8$ and $LTM_{\varphi} = 48 \pm 8$, $ARM_{\sigma} = 20 \pm 10$ and $ARM_{\varphi} = 25 \pm 10$; $t < 0.81$, $P > 0.42$, 98 df). LTM and ARM performances were significantly different, 24 h individual scores being higher with the spaced procedure than the massed procedure (Fig. 1; $t = 2.34$, $P = 0.020$, 215 df).

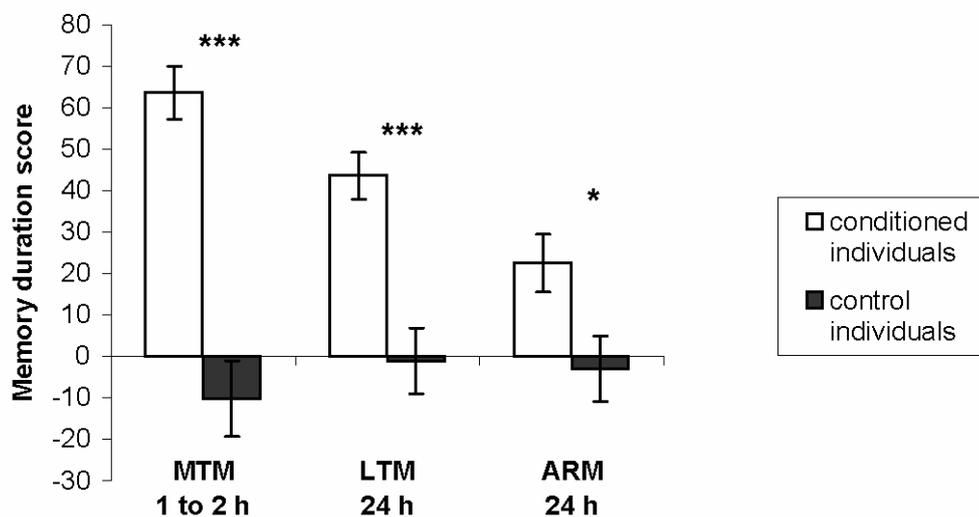


Figure 1: Mean individual memory performance

We compared individual duration scores induced by associative (conditioned individuals) and unpaired (control individuals) procedures of one-trial protocol (MTM: $N = 94$; control: $N = 88$ individuals, test 1-2h after conditioning), of spaced protocol (LTM and control: $Ns = 100$ individuals, test 24h after conditioning) and of massed protocol (ARM: $N = 120$; control: $N = 96$ individuals, test 24h after conditioning). Data represent the mean \pm standard error of the mean. Stars indicated significant differences between conditioned and control individuals, at P -value inferior to 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***).

After the short and the spaced protocols, duration scores distributions were significantly different from that of the controls (Table 1; $\chi^2 > 24.73$, $P < 3e^{-5}$, 4 df). The majority of trained flies showed high scores, higher or equal to 60 for the short protocol. As expected the performance of LTM-trained flies was slightly lower, as shown by a sliding of scores to the immediate inferior class (20 to 60). For ARM-trained flies, low performance did not

correspond to such a sliding to inferior positive scores, but to the presence of flies with very bad scores (inferior to -60). The distribution of ARM individual scores was therefore more bipolar, and not significantly different from the distribution of control individuals (Table 1; $\chi^2 = 6.57, P = 0.16, 4 \text{ df}$). This suggests a random choice of odours for a part of ARM flies.

	-100 to -60	-60 to -20	-20 to 20	20 to 60	60 to 100
MTM - 1 to 2 h	7%	7%	3%	5%	77%
LTM - 24 h	7%	10%	11%	25%	47%
ARM - 24 h	24%	5%	14%	12%	45%
MTM control	45%	6%	7%	7%	35%
LTM control	34%	12%	7%	13%	34%
ARM control	35%	10%	11%	12%	32%

Table 1: Distribution of individual duration scores.

Individual memory time scores were distributed in 5 classes ranging from -100 to 100. The table presents the percentage of flies in each class, for conditioned and control flies of MTM, LTM and ARM. Bold data emphasize class with higher values for each memory types. For numbers of flies, see legend of Figure 1.

Evolution of position memory scores along the test

Because of the cumulative process of the duration analysis, the evolution of the conditioned response was analysed with position data.

Individuals conditioned with the short or the spaced protocol showed a significant higher score than their respective control individuals from the beginning of the test (Fig. 2A, B; $\chi^2_{\text{Haber}} > 8.91, P < 0.005, 1 \text{ df}$). On the contrary ARM-trained individuals made their first choice at random like control individuals (Fig. 2C; $\chi^2_{\text{Haber}} = 0.019, P > 0.80, 1 \text{ df}$). Thus, the bipolar distribution of duration scores for control and ARM-trained flies might be linked to the random first choice (Table 1). We thus analysed the effect of the first choice on the evolution of position scores during the test.

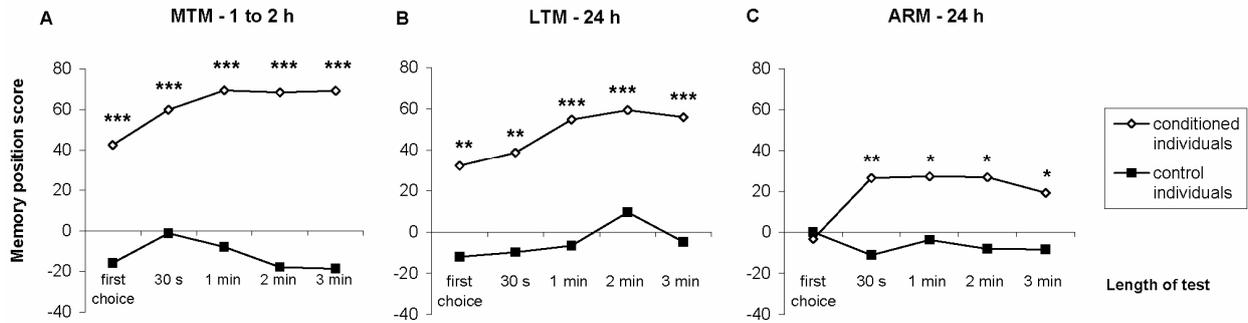


Figure 2: Evolution of the individual memory score along the test.

The individual memory score was established from the position of individuals at each observation time until the end of the 3-min test, for conditioned and control flies, in the case of MTM (A), LTM (B) and ARM (C). For numbers of flies and signification of stars, see legend of Figure 1.

Effect of the first choice on the evolution of individual memory scores

For all control procedures, the effect of the first choice disappeared progressively during the test, as seen from non significantly different scores after the first minute at the latest (Fig. 3; $\chi^2_{\text{Haber}} < 2.56$, $P > 0.10$, 1 df). Control flies that chose the first odour at random, generally did not stay in this odour during all the test.

After an incorrect first choice, all categories of trained flies had higher scores at 30 s than control flies (Fig. 3A vs B, C vs D, E vs F; $\chi^2_{\text{Haber}} > 3.1$, $P < 0.05$, 1 df). This suggests that the memories generated after the various procedures allowed flies to recognize and leave the incorrect odour significantly before 30 sec of test.

In MTM and LTM-trained flies, the effect of the incorrect first choice even disappeared during the test, as scores of “mistaken” flies met up with that of “right” flies, without anymore significant difference from the first minute of test (Fig. 3A, C; $\chi^2_{\text{Haber}} < 3.21$, $P > 0.05$, 1 df). On the contrary for ARM-trained flies, the incorrect first choice had an irreversible effect on the score, which remained close to 0 from 30 sec to the end of the test (Fig. 3E; comparison with zero value: $\chi^2_{\text{Haber}} = 0.32$, $P > 0.70$, 1 df). Flies choosing the correct odour maintained a higher score than flies choosing the incorrect odour until 2 min (Fig. 3E; $\chi^2_{\text{Haber}} > 6.15$, $P < 0.02$, 1 df) but their score decreased progressively and it was no more significant at 3 min (Fig. 3E; $\chi^2_{\text{Haber}} = 3.40$, $P > 0.05$, 1 df).

To understand better the mechanisms that sustain the evolution of memory scores, we then analysed the exploratory behaviour during the test. In particular we recorded the latency of the first choice, the frequency of odour changes in function of the first choice, and the locomotor activity in both odours.

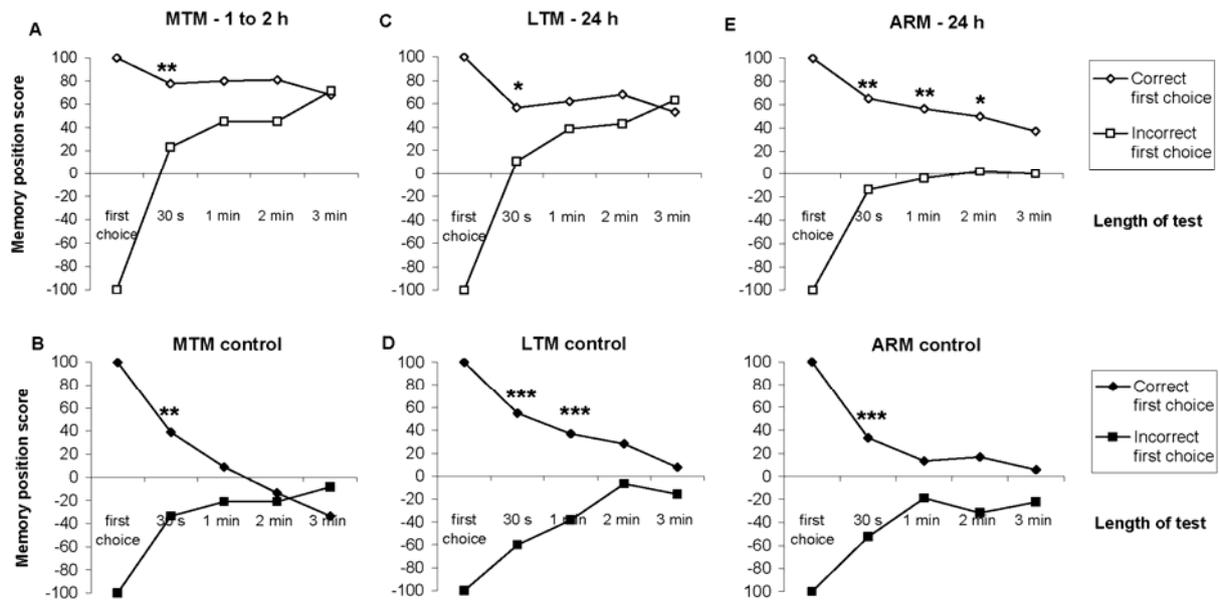


Figure 3: Effect of the first choice on the evolution of the individual memory score.

Position scores were calculated for two categories of flies in function of their first choice, in the case of MTM ($N_{\text{correct first choice}} = 67$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 27$) (A) and MTM control ($N_{\text{correct first choice}} = 37$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 51$) (B), of LTM ($N_{\text{correct first choice}} = 66$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 34$) (C) and LTM control ($N_{\text{correct first choice}} = 44$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 56$) (D), and of ARM ($N_{\text{correct first choice}} = 58$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 62$) (E) and ARM control ($N_{\text{correct first choice}} = 48$; $N_{\text{incorrect first choice}} = 48$) (F). For signification of stars, see legend of Figure 1.

Latency of the first choice does not depend on the odour status

Flies left the central part of the T-maze and made their first odour choice in a median time of about 4 s without difference between paired and control procedures (No fig.; $F_{0.05(1, 594)} = 3.08$, $P = 0.079$), nor between the three memory types (No fig.; $F_{0.05(2, 594)} = 2.78$, $P = 0.063$). Moreover, for all memory types, the latency of the first choice did not depend on the odour (conditioned or not) (No fig.; $t < 1.03$, $P > 0.31$, 60 df).

Different patterns of transition between the odours in function of the memory type

The mean number of changes between the odours was equal to 2.8 ± 0.3 , 1.3 ± 0.2 and 1.8 ± 0.2 changes for LTM, MTM and ARM-trained flies respectively. This number was significantly higher in LTM-trained flies (No fig.; LTM vs MTM and ARM: $t > 3.06$, $P < 0.003$, 193 df; MTM vs ARM: $t = 1.62$, $P = 0.11$, 209 df). This characteristic of LTM-trained flies depends on the associative memory, as these flies showed a higher transition rates than LTM-control flies, that made only 1.5 ± 0.2 odours changes (No fig.; $t = 40.7$, $P = 7e^{-5}$, 177 df). MTM and ARM-trained flies had similar transition rates than their control flies, with

respectively 1.3 ± 0.1 and 2.4 ± 0.3 changes for MTM and ARM-control flies (No fig.; $t < 1.70$, $P > 0.09$, 175 df).

The distribution of flies as a function of the number of changes between odours is represented on Fig 4. For all control procedures, the distributions did not depend on the first odour choice, suggesting that flies stopped at random in one of the two odours progressively until the end of the test (Fig. 4B, D, F; $\chi^2 < 8.003$, $P > 0.15$, 5 df). 1/3 of flies stayed in the first odour and again nearly 1/3 stayed in the second, opposite, odour. It explains why the position score of control flies tended toward 0 after the first choice (Fig. 3B, D, F).

In the case of the three memory types, the distributions depended on the first odour choice (Fig. 4A, C, E; $\chi^2 > 13.2$, $P < 0.033$, 6 df). Higher percentage of flies stayed in the first odour when it was the correct one (Fig. 4A, C, E; $\chi^2_{\text{Haber}} > 10.20$, $P < 0.01$, 1 df).

For MTM and ARM-trained flies, a part of flies never left the first odour during the test, despite the fact it was the incorrect one. This participated to maintain the effect of the incorrect first choice on position score until the end of the test for ARM-trained flies (Fig. 3 E), which were more numerous than after MTM-training (24 % vs 15 %). In the case of LTM, no flies stayed in the incorrect odour after an incorrect first choice (Fig. 4C). The first choice had thus less influence on LTM scores than ARM and MTM scores (Fig. 3A, C, E).

For flies leaving the first odour, higher percentage of flies stayed in the second odour when it was the correct, for the three types of conditioning (Fig. 4A, C, E; $\chi^2_{\text{Haber}} > 4.55$, $P < 0.05$, 1 df). Flies leaving the incorrect odour pull position score towards positive value after the incorrect first choice, explaining the fast increase of position score for the three memories (Fig. 3A, C, E). For ARM however, flies did not show anymore avoidance of the incorrect odour from the second odour change (Fig. 4E; $\chi^2_{\text{Haber}} < 0.84$, $P > 0.30$, 1 df). This apparent random choice would be at the origin of the decrease of the positive position score after the correct first choice and of the stagnation close to 0 of the score after the incorrect first choice (Fig. 3E). Similarly, MTM-trained flies did not avoid the incorrect odour from the second odour change (Fig. 4A; $\chi^2_{\text{Haber}} < 1.34$, $P > 0.20$, 1 df). For LTM, the conditioned response was present for a longer time, flies showing no more significant avoidance only from the third odour change (Fig. 4C; $\chi^2_{\text{Haber}} < 2.18$, $P > 0.10$, 1 df). In LTM-trained flies, avoidance of the incorrect odour is therefore a more dynamic choice than in MTM and ARM-trained flies.

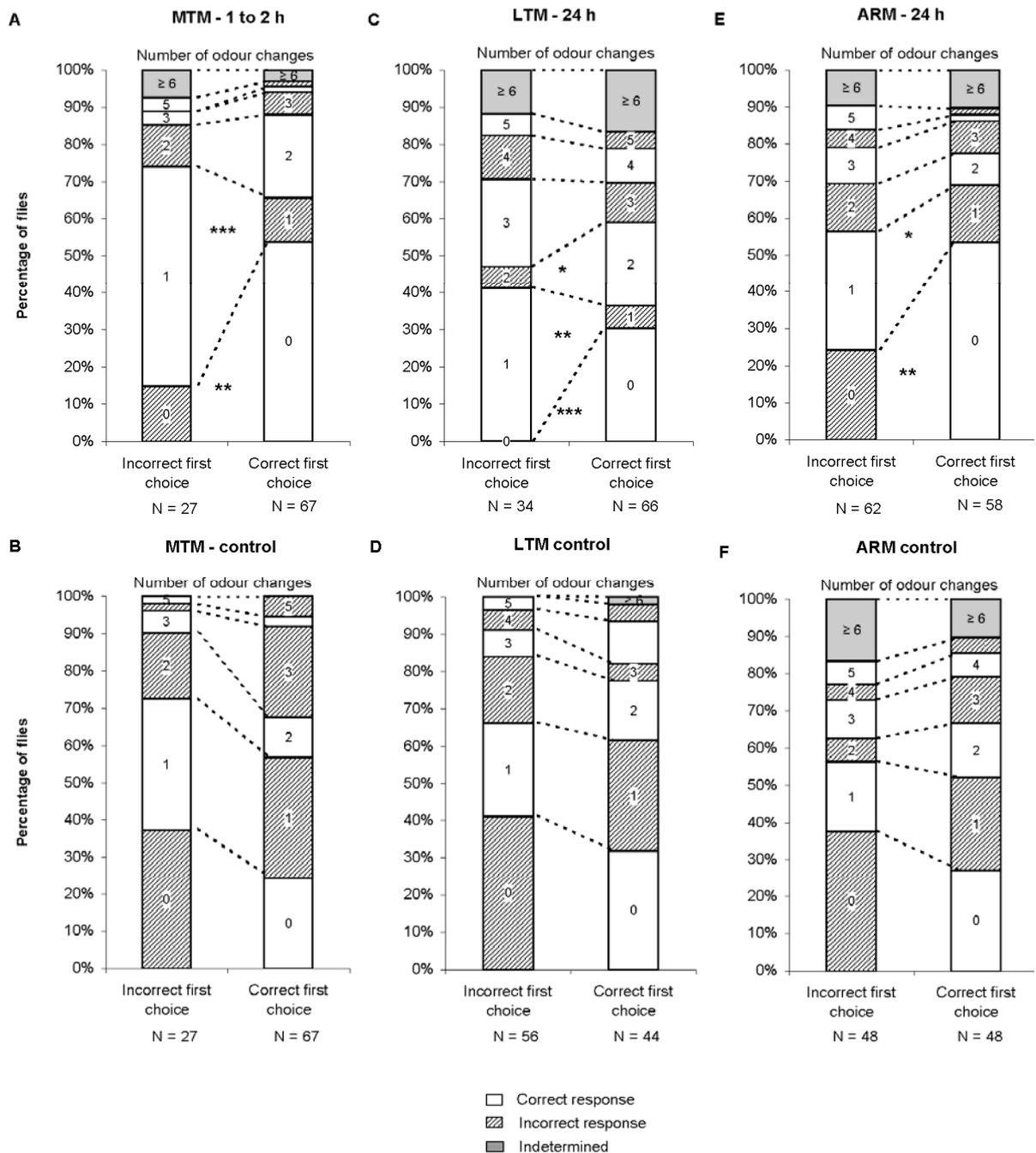


Figure 4: Number of odour changes in function of the first choice.

Graphs represent the distribution of flies in function of their number of odour changes during the test, for each category of first choice (correct vs incorrect), in the case of MTM (A), MTM control (B), LTM (C), LTM control (D), ARM (E) and ARM control (F). For numbers of flies, see legend of Figure 3 and for signification of stars, see legend of Figure 1.

Locomotor activity is higher in the conditioned odour

The locomotor activity decreased along the test, with a correlative significant increase of time of pause, in both conditioned and control flies (Table 2; $t > 8.85$; $P < 9e^{-16}$; 175 df). This decrease of the exploratory activity explains the limited mean number of odour changes, and the fact that individual memory scores reached their plateau from 1 min of test (Fig. 2).

	0 to 1 min	1 to 3 min	P-value
MTM - 1 to 2 h	15 ± 2 %	53 ± 3 %	4E-19
LTM - 24 h	10 ± 1 %	39 ± 2 %	2E-21
ARM - 24 h	11 ± 1 %	42 ± 3 %	2E-21
MTM control	21 ± 2 %	55 ± 3 %	2E-16
LTM control	13 ± 2 %	37 ± 2 %	9E-16
ARM control	13 ± 2 %	39 ± 3 %	6E-16

Table 2: Evolution of the percentage of time spent in pause during the test.

Mean percentage of time spent in pause during both periods of 0 to 1 min and of 1 to 3 min, for conditioned and control flies of MTM, LTM and ARM. Data represent the mean ± standard error of the mean. For numbers of flies, see legend of Figure 1.

For the three types of memory, trained flies spent more time pausing in the correct than in the incorrect odour (Table 3; $t > 3.54$; $P < 5e^{-4}$; 192 df). Flies thus seem calmer when they are in the correct odour. This holds in particular for ARM-trained flies staying in the correct odour from the first choice as they were calmer than those staying in the incorrect odour (No fig.; $t = 2.57$, $P = 0.014$, 41 df). This suggests that memory of flies staying in the incorrect odour was not completely erased. In contrast, ARM-trained flies making at least two odour changes had similar times of pause in both odours (No fig.; $t_{\text{paired}} = 1.21$, $P = 0.23$, 43 df). This suggests that, for these flies, memory was erased or made inaccessible before or during the test, which is coherent with their random odour choice. Similarly, MTM-trained flies choosing odour at random from the third change had no more either difference of locomotion (No fig.; $t_{\text{paired}} = 0.56$, $P = 0.59$, 11 df). In contrast, LTM-trained flies choosing odour at random from the third change continued to show this difference of locomotion between both odours (No fig.; $t_{\text{paired}} = 2.79$, $P = 0.009$, 34 df), suggesting that their memory was still accessible.

A higher locomotion in the incorrect odour could help the flies leaving it, but this was not enough to avoid ARM-trained flies staying in the incorrect odour. We thus analysed the exploratory activity of flies in both odorized arm of the T-maze.

	Correct odour	Incorrect odour	P-value
MTM - 1 to 2 h	32 ± 3 %	6 ± 1 %	1E-10
LTM - 24 h	27 ± 2 %	12 ± 2 %	0,0003
ARM - 24 h	27 ± 3 %	15 ± 2 %	0,0002

Table 3: Percentage of time spent pausing in the correct and incorrect odours.

Mean percentage of time spent in pause, when flies were in the correct and in the incorrect odour, on the entire period of the test (0 to 3 min), for MTM ($N_{\text{correct odour}} = 90$; $N_{\text{incorrect odour}} = 58$), LTM ($N_{\text{correct odour}} = 100$; $N_{\text{incorrect odour}} = 80$) and ARM-trained flies ($N_{\text{correct odour}} = 105$; $N_{\text{incorrect odour}} = 89$). Data represent the mean ± standard error of the mean. For signification of stars, see legend of Figure 1.

Time spent in proximal and distal zones of the T-maze arms in function of the odours

MTM and LTM-trained flies spend more time in the short proximal zone than in the long distal zone of the arm carrying the incorrect odour (Table 4; $t_{\text{paired}} > 1.99$, $P < 0.05$, 80 df), while they spent as much time in both zones of the arm with the correct odour (Table 4; $t_{\text{paired}} < 1.05$, $P > 0.30$, 89 df). MTM and LTM-trained flies did not enter deeply in the incorrect odour, which may improve the fact to leave it. In contrast, ARM-trained flies spent as much time in the proximal zone than in the distal zone, for both odours (Table 4; $t_{\text{paired}} < 1.05$, $P > 0.30$, 104 df). Furthermore, ARM-trained flies staying in the incorrect odour from the beginning of the test passed more time in the distal zone than in the proximal zone (No table; $t = 6.63$, $P < 1e^{-5}$, 14 df), a position not favourable to leave the incorrect compartment.

	MTM - 1 to 2 h		LTM - 24 h		ARM - 24 h	
	Incorrect odour	Correct odour	Incorrect odour	Correct odour	Incorrect odour	Correct odour
Proximal zone	69 ± 5 %	46 ± 3 %	58 ± 4 %	48 ± 3 %	50 ± 4 %	53 ± 3 %
Distal zone	31 ± 5 %	54 ± 3 %	42 ± 4 %	52 ± 3 %	50 ± 4 %	47 ± 3 %
P-value	0,0002	0,30	0,0498	0,49	0,92	0,30

Table 4: Time spent in proximal and distal zones of the T-maze arms in function of the odours.

Data represent the mean percentage of time (± standard error of the mean) spent by each fly in the proximal and distal zones of the arms carrying the unconditioned and conditioned odours respectively, for MTM, LTM and ARM-trained flies. For numbers of flies, see legend of table 3.

Evolution of group memory scores along the test

We tested memory performance of groups from which individuals had been taken for the individual performance analysis. For the three conditioning procedures, the trained group showed a higher score than its specific control group at 1, 2 and 3 min of test (Fig. 5A, B, C; $t > 5.56$, $P < 5e^{-5}$, 15 df). MTM performances were similar in individual tests and tests of groups (Fig. 5A; $t < 0.81$, $P > 0.44$, 11 df). As described elsewhere (Chabaud *et al.* submitted), we verified that LTM-trained flies had a slight tendency to show higher performances when tested individually, with a significant difference only at 2 min of test (Fig. 5B; test unilateral: $t = 3.29$, $P = 0.002$, 18 df). We also verified that a positive effect on scores of ARM occurred when ARM-trained flies were tested in group, which here was progressive and became significant only from 2 min, where the score of the group became superior to those of the individuals (Fig. 5C; test unilateral: $t > 2.51$, $P < 0.014$, 11 df).

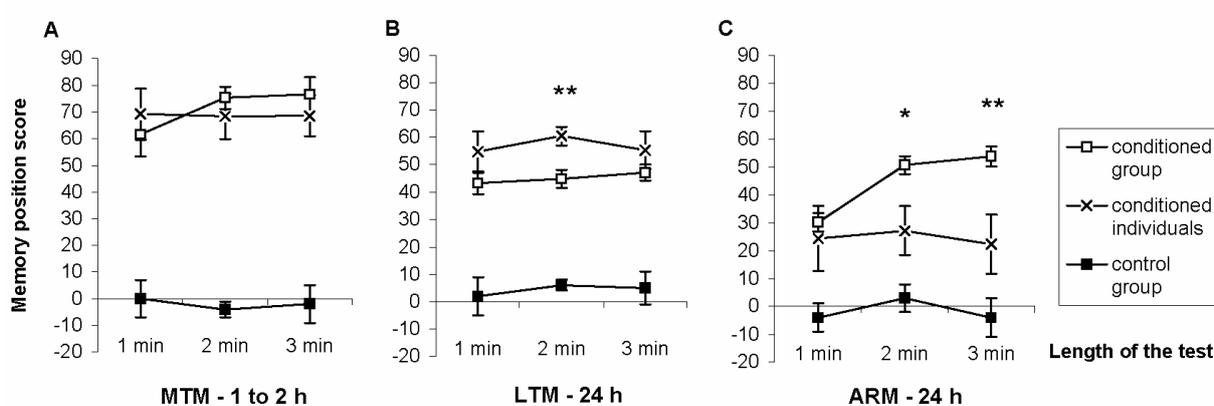


Figure 5: Evolution of group memory scores along the test

Group memory scores were established from the groups from which flies had been taken for the individual performance analysis. Groups were tested either at 1, 2 or 3 min of test in the case of MTM ($N_{\text{conditioned group}}=5-6$; $N_{\text{control group}}=4-6$) (A), LTM ($N_{\text{conditioned group}}=15-18$; $N_{\text{control group}}=8-9$) (B) and ARM ($N_{\text{conditioned group}}=15-16$; $N_{\text{control group}}=9$) (C). Data represent the mean \pm standard error of the mean. Mean individual position scores and their standard error were calculated from 8-10 pools of 12 consecutive individual position results (6 flies conditioned to each odour) to reconstitute a memory score similar in essence to that of a group score. Stars indicated significant differences between conditioned groups and individuals, at P -value inferior to 0.05 (*), 0.01 (**) or 0.001 (***).

Discussion

Characteristics of the individual conditioned response in function of the memory type

The memory performance is measured by the avoidance response to the conditioned odour. This response involves first recognizing the odour, recalling its conditioned repulsive character, then deciding to avoid it and making an appropriate move. Only the last item can be

observed but detailed characterisation of the conditioned behaviour during the retrieval provides information on early stages of retrieval mechanisms.

MTM and LTM-trained flies have an efficient memory retrieval that they use from the beginning of the test. They realise all stages from the recognition of the odour to the adapted response in about 4 s. At contrary, the random first choice of ARM-trained flies (Fig. 2C) suggests that they don't recognize immediately the conditioned repulsive character of the odour. Apparently ARM is not efficient enough to avoid entering and exploring the arm delivering the incorrect odour, but enough to allow the majority of flies not staying there (Fig. 4E). The fact that trained flies left the incorrect odour earlier than control flies (Fig. 3E) suggests that they remembered the repulsive character of the odour with latency. The first choice has a major effect for ARM-trained flies, as it is definitive for half the flies which made the correct choice, but also for part of the flies which made the incorrect choice. ARM-trained flies staying in the first odour seem to have still memory, because their locomotion is different in function of the odours and they seem calmer in the correct odour (Table 3). They may have however a deficit of memory retrieval, strong enough to suppress the avoidance response. They may also not be able to exit from the incorrect arm when engaged deeply, and they may finally be subjected to extinction to the incorrect odour. After a low number of odour changes, MTM and ARM-trained flies did not show anymore conditioned behaviours, suggesting that their memory was erased during these odour changes by a mechanism of extinction.

LTM-trained flies shifted more often between the odours than MTM and ARM-trained flies, without hampering good individual memory performances. LTM flies left then re-enter in the correct odour frequently and avoid staying in the incorrect odour several times during the test. In LTM-trained flies, avoidance of the incorrect odour therefore appears to be a dynamic process. After a certain number of odour changes, they may be sensitive to a mechanism of extinction at the origin of a random odour choice, but less than MTM and ARM-trained flies as this occurred after a higher number of odour changes, and as they continued to behave differently in function of the odour. Considering the decrease of performance as a decrease of memory and retrieval efficiency, forgetting might be more gradual for LTM-trained flies and more radical for ARM-trained flies. The bipolarity of duration scores of ARM however did not reflect different populations of flies with or without memory, but, as for control flies, the expression of random choices in a probabilistic way in every flies, as suggested by Quinn *et al.* (1974)

Contrarily to LTM, several characteristics of the MTM conditioned response were similar to that of ARM conditioned response, with similar low transition rate between the odours, the existence of a part of flies which never left the first odour despite the fact it was the incorrect

and a potential phenomenon of extinction that occurred from the second odour change, earlier than for LTM (Fig. 4A, C, E) and from that flies did not show anymore difference of locomotion in function of the odours. The characteristics of the ARM conditioned response seem to derive from that of MTM, especially as ARM is already present 1h30 after the short protocol. In contrast, the clearly distinct and robust conditioned response after the spaced procedure would be due to the specific mechanism of LTM storage, protein-synthesis dependent. This suggests that distinct memories are expressed 24h after massed and spaced procedures, as predicted by the model of exclusivity of ARM and LTM (Isabel *et al.* 2004), or at least that LTM expression is dominant compared to ARM expression, if ARM and LTM coexist as proposed by Tully *et al.* (1994).

Length of the test and habituation

1 or 2 min of test seem to be adapted to visualize maximum individual responses, because individual position scores have reached their plateau (Fig. 2A, B, C) and the effect of the first choice has disappeared in the case of MTM, LTM and control procedures, except for ARM-trained flies for which the effect of the first choice does not disappear. Group position scores reached their plateau at least from 1 min for MTM and LTM, but only from 2 min for ARM. The latency of response for groups of ARM-trained flies must be taken in consideration for analyses of ARM performances. The analysis of individual exploratory behaviour suggests that extinction occurred during the test (Fig. 4A, C, E), which may be due to the absence of negative reinforcements during the test. Extinction would be at the origin of the significant decrease of locomotion after 1 min and of random odour choice after repetitive changes. Similar processes of habituation (for naïve individuals) have been described to reduce avoidance for odours in flies (Tully and Quinn, 1985; Schwaerzel *et al.*, 2002) and in *Blattella germanica*, where habituation is also involved when repetitive exploration of a limited space leads to a decrease of the exploratory activity (Darchen 1952). In the bee *Apis mellifera*, extinction begins from the first presentation of the conditional stimulus without reinforcement (Bitterman *et al.*, 1983; Sandoz and Pham-Delègue, 2004), suggesting that extinction could also be involved for flies staying in the incorrect odour from the beginning of the test.

Hypotheses for the positive effect of group on ARM performances

We showed recently that ARM-trained flies tested in group have higher memory performance than tested individually (Chabaud *et al.*, submitted). Here, we show that this group effect occurred progressively during the test until 2 min (Fig. 5C). The analysis of the characteristics of the individual ARM performance provides several leads which could be involved in the positive group effect. The presence of the other ARM-trained flies could thus help to avoid

choosing the first odour at random, entering deeply in the arm of the incorrect odour and so staying within it, and finally to avoid a fast extinction to the incorrect odour.

Interactions produced by ARM-trained flies in group would limit random exploratory behaviours and fast extinction to the conditioned odour by creating a context not favourable for memory extinction, such as a context of stress linked to latent danger. Suh *et al.* (2004) have shown that *Drosophila*, when stressed by experimental stimuli such as mechanical agitation and electrical current, emits an odorant mixture that elicits avoidance in other flies, and they have identified CO₂ as one active component of this mixture. The positive group effect might result from such mechanism.

Conclusion

This work documents how flies use individually their avoidance memory in function of the conditioning procedure and memory nature. Some characteristics could be taken into account for investigations of memory performance in individuals, for the adaptation of testing procedures and for imagery investigations of neuronal activity involved in memory retrieval.

References

- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A and Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97: 107-119.
- Chabaud MA, Isabel G, Kaiser L and Preat T (Submitted) Social interactions enhance long-lasting memory retrieval in *Drosophila*.
- Darchen R (1952) Sur l'activité exploratoire de *Blattella germanica*. *Zeitsch. Tierpsychol.* 9: 363-372.
- Devaud JM (2003) Experimental studies of adult *Drosophila* chemosensory behaviour. *Behav. Proc.* 64: 177-196.
- Isabel, G., Pascual, A., and Preat, T. (2004). Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, 1024-1027.
- Phelan LL, Rodd Z, Byers D and Rosellini RA (1998) Odor passive avoidance learning in *Drosophila melanogaster*: parametric investigations of unconditioning stimulus intensity and inter-trial-interval. *Learn. Motiv.* 29: 83-101.
- Quinn WG, Harris WA and Benzer S (1974) Conditioned behaviour in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* 71(3): 708-712.
- Sandoz JC and Pham-Delègue MH (2004) Spontaneous recovery after extinction of the conditioned proboscis extension response in the Honeybee. *Learn. Mem.* 11: 586-597.

- Suh GSB, Wong AM, Hergarden AC, Wang JW, Simon AF, Benzer S, Axel R and Anderson DJ (2004) A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* 431: 854-859.
- Schwaerzel M, Heisenberg M and Zars T (2002) Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35(5): 951-960.
- Tully, T. and Quinn, W.G. (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* 157(2): 263-77
- Tully, T., Boynton, S., Brandes, C., Dura, J.-M., Mihalek, R., Preat T. and Villella, A. (1990) Genetic dissection of memory formation in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55: 203-211.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., and Del Vecchio, M. (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, 35-47.
- Waddell S and Quinn WG (2001) What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *TRENDS in Genet.* 17(12): 719-726.
- Wallace B and Sperlich D (1988) Conditioning the behavior of *Drosophila melanogaster* by means of electric shocks. *Neurobiol.* 85: 2869-2872.
- Zar, J.H. (1999) *Biostatistical analysis*. Prentice Hall Uppler Saddle River, NJ, p 663

IV. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES: RECHERCHE DES MECANISMES DE L'EFFET POSITIF DU GROUPE

La suite du projet se concentre sur l'analyse de l'effet positif du groupe pour la MRA. Différentes pistes ont été testées pour caractériser la nature et les mécanismes de cet effet du groupe. L'effet du groupe est initialement défini par un score de groupe supérieur au score individuel à partir de 2 min de test. Les résultats de MRA 24 h et 48 h après conditionnement montraient que l'effet de groupe s'accompagnait d'une augmentation significative du score de groupe entre 1 et 2 ou 3 min de test. Nous avons donc fait l'hypothèse que les facteurs impliqués dans l'augmentation du score de groupe sont les mêmes qui induisent l'effet de groupe. Pour faciliter l'analyse de l'effet de groupe, nous nous sommes donc basés sur cette hypothèse pour analyser quels facteurs seraient impliqués dans l'augmentation du score de groupe de ARM. Nous avons appliqué le protocole de conditionnement massé, et 24 h après conditionnement, nous avons comparé les scores entre 1 min et 3 min de test, en étudiant l'effet de différents paramètres.

Les mouches semblent utiliser l'information sociale pour se positionner correctement dans la bonne odeur au cours du test. Nous avons tout d'abord analysé l'implication potentielle des interactions sexuelles. Qu'il s'agisse d'une communication active entre les individus (envoi et réception de signaux d'agrégation ou de signaux d'alarme) ou uniquement de la facilitation sociale du rappel de la mémoire, les interactions pourraient impliquer des entrées sensorielles telles que la vision, l'olfaction ou l'audition. La suite de notre démarche a donc été de rechercher quel type d'information était principalement utilisé.

4.1 Implication d'interactions sexuelles ?

Dans l'analyse de la réponse conditionnée individuelle, les scores de position individuels de MMT et de MLT à 24 h des mâles et des femelles sont similaires au cours des 3 min de test ($\chi^2_{Haber} < 0.97, P > 0.25, 1 \text{ ddl}$). Dans le cas de la MRA par contre, le score des mâles est inférieur à celui des femelles au premier choix de l'odeur ($\chi^2_{Haber} = 4.81, P < 0.05, 1 \text{ ddl}$). Ce sont donc surtout les mâles qui présentent un choix non conditionné au début du test, mais ils rattrapent progressivement le score des femelles au cours du test, avec une différence marginale à 30 s ($\chi^2_{Haber} = 3.4, 0.10 < P < 0.05, 1 \text{ ddl}$) et nulle à partir de 1 min ($\chi^2_{Haber} < 0.16, P > 0.50, 1 \text{ ddl}$).⁴⁴

⁴⁴ On avait également obtenu un dimorphisme sexuel au niveau de la procédure de pseudo-conditionnement en 1 cycle, testée à 1-2 h: les femelles présentaient un score négatif descendant jusqu'à -45, significativement plus faible que le score des mâles à partir de 2 min de test ($\chi^2_{Haber} > 4.18, P < 0.05, 1 \text{ ddl}$). Les femelles avaient donc tendance à préférer l'odeur présentée 2 min après les chocs électriques, et donc à associer cette odeur avec de l'apaisement (Tanimoto *et al.* 2004).

Comme nous avons comptabilisé le nombre de mâles et de femelles pour le calcul du score de groupe, il avait été aisé de calculer leur ratio au sein des groupes mixtes et de ré-analyser les données en séparant les sexes. Pour les trois types de mémoire, il y avait légèrement plus de femelles que de mâles au sein des groupes (avec un ratio femelles/mâles compris entre 1 et 2), dû au fait que les premières émergences des bouteilles d'élevage sont généralement surtout des femelles. Pour la MMT et la MLT, les scores des femelles et des mâles au sein des groupes mixtes n'étaient pas significativement différents pour les différentes durées de test ($t < 1.02$, $P > 0.27$, 6 ddl). Pour la MRA, l'augmentation du score en fonction de la durée du test était sensiblement plus lente pour les mâles que pour les femelles, avec un score légèrement plus bas que les femelles à 2 min (différence non significative marginale: $t = 1.85$, $P = 0.07$, 30 ddl).

Hypothèse de l'attraction sexuelle

L'analyse individuelle et en groupe mixte n'a pas montré de différences nettes de performance entre les mâles et les femelles pouvant expliquer l'effet groupe, mais les tendances observées laissent penser que les interactions sexuelles pourraient tout de même être impliquées. L'augmentation du score entre 1 et 3 min pourrait par exemple être liée à un comportement de suivi des femelles par les mâles. Les interactions impliqueraient principalement des voies chemiosensorielles (phéromones sexuelles) ou auditives (sons produits par les ailes).

Protocole

Nous avons comparé entre 1 et 3 min les scores de groupes constitués exclusivement de femelles ou de mâles, ce qui élimine les possibilités d'attraction ou de communication sexuelle pendant le test. Un groupe mixte de sexe ratio 1:1 est utilisé comme contrôle. Les individus des trois groupes sont prélevés à l'émergence et triés par sexe sous loupe binoculaire en les endormant à l'aide d'une courte anesthésie au CO₂ (moins de 30 s). Les groupes sont composés de 30-40 individus.

Résultats

Les groupes de sexes séparés, mâles ou femelles, présentent une augmentation significative du score entre les tests à 1 min et 3 min aussi bien chez les mâles que chez les femelles, et de manière similaire au groupe contrôle mixte (Fig. 24; $t > 2.19$, $P < 0.02$, 28 ddl).

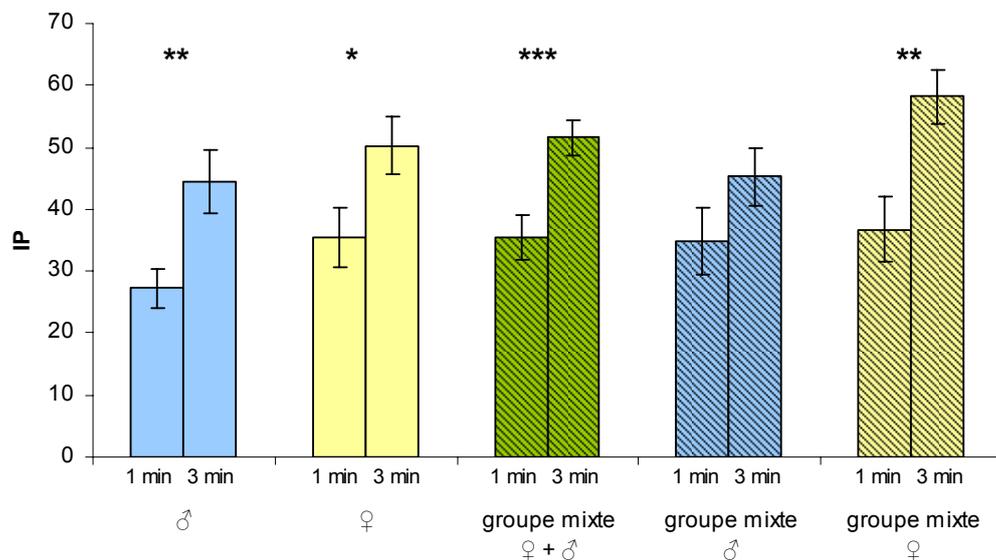


Figure 24: Analyse de l'attractivité sexuelle comme facteur potentiel de l'effet de groupe en MRA. Le score de MRA est testé 24 h après conditionnement massé sur des groupes de mâles (N=15), des groupes de femelles (N=15) et des groupes témoins mixtes (N=18), pour des durées de test de 1 ou 3 min. Pour les groupes témoins, nous avons également représenté séparément le score des mâles et le score des femelles faisant partis des groupes mixtes.

Conclusion

Nous pouvons donc conclure que les interactions sexuelles ne sont pas indispensables à l'augmentation du score entre 1 et 3 min.

Dans le groupe mixte cependant, l'analyse séparée des scores pour chaque sexe montre que l'augmentation est plus restreinte pour les mâles, et n'est même plus significative dans cette expérience (Fig. 24; $t = 1.45$, $P = 0.07$, 33 ddl). Dans cette expérience, il semble que l'augmentation de leur score ait débuté avant 1 min de test.

4.2 Implication de signaux visuels ?

Hypothèse

Bien qu'il soit reconnu que les drosophiles ont une vision réduite en lumière rouge, la luminosité induite par la table lumineuse pourrait être suffisante pour qu'elles utilisent les informations visuelles. L'effet de groupe pourrait donc provenir de signaux visuels.

Protocole

Nous avons comparé des groupes contrôles testés sur table lumineuse avec des groupes testés dans le noir complet (table lumineuse éteinte, et en ayant pris soin de calfeutrer toutes sources lumineuses de la pièce), où les interactions visuelles sont absentes (Ganguly-Fitzgerald *et al.* 2006). Nous avons effectué un test à 1 min et 3 min pour vérifier si

l'augmentation du score avait toujours lieu dans le noir complet. Pour chaque situation, 9 groupes ont été testés.

Résultats

Le score de mémoire augmente entre 1 et 3 min de manière significative dans le noir complet (Fig. 25; Test bilatéral; $t > 2.16$, $P < 0.048$, 16 ddl) comme avec l'éclairage à la table lumineuse (Fig. 25; Test unilatéral; $t > 3.36$, $P < 0.002$, 16 ddl). Les scores ont cependant tendance à être plus variables dans le noir complet, à effectifs égaux.

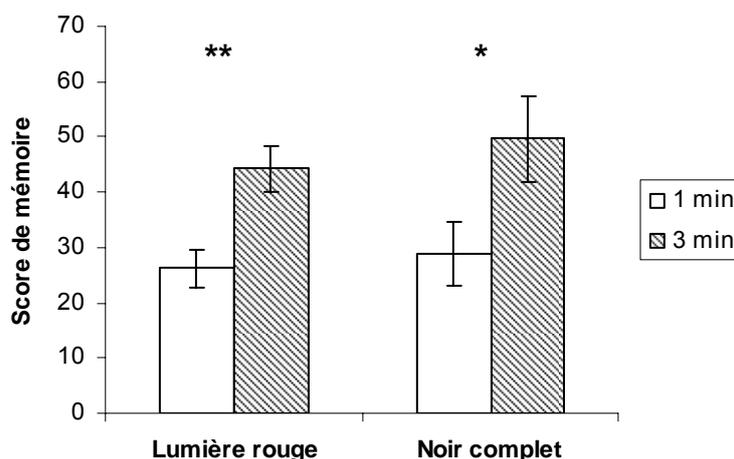


Figure 25: Recherche de l'implication de signaux visuels dans l'augmentation du score de MRA en groupe entre 1 et 3 min. Des groupes de mouches sont testés dans le noir complet ou sur table lumineuse diffusant de la lumière rouge pour des durées de test de 1 et 3 min ($N_s = 9$). Le graphique représente le score de mémoire moyen \pm l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles signalent une différence significative avec une probabilité de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ou *** $P < 0.001$.

Conclusion

La vision n'est pas une entrée sensorielle indispensable aux interactions impliquées dans l'augmentation du score entre 1 et 3 min de test, mais elle pourrait y participer.

4.3 Implication de signaux auditifs ?

Hypothèse

Pour déterminer l'importance de l'audition dans l'effet de groupe, nous avons d'abord pensé annuler la voie de réception des sons par l'utilisation de mutants de l'audition, tels que les mutants *atonal* et *beethoven* (pour revue, voir Tauber et Eberl 2003). Mais ces mutants étant affectés également sur d'autres processus de développement (respectivement vision et locomotion) ou n'étant pas du même fond génétique que la souche *CS* (souche *Oregon* pour le mutant *atonal*) (Eberl *et al.* 1997; Göpfert *et al.* 2002), nous avons opté pour annuler la

production de sons plutôt que la réception. Les vibrations alaires constituent la seule manière connue de communiquer via la fonction auditive chez la mouche (essentiellement impliquée dans la communication entre mâles et femelles durant la parade sexuelle; Rybak *et al.* 2002). Nous avons donc décidé de cibler cette expérience sur la recherche de signaux auditifs produits par les ailes.

Pour rester objectif, il est possible que les mouches produisent et soient sensibles à d'autres sons dans l'appareil de test, comme par exemple les bruits de pattes occasionnés lors de leurs déplacements, etc...

Protocole

24 h avant le conditionnement massé, nous avons préparé des groupes de mouches sans ailes en coupant les ailes des mouches émergentes sous anesthésie au CO₂ (Fig. 26A), et des groupes de mouches contrôles en les plaçant sous anesthésie pendant une durée équivalente. Puis 24 h après conditionnement, nous avons testé leurs performances respectives de MRA entre 1 et 3 min, dans les conditions habituelles de test (lumière rouge au plafond, sans table lumineuse). Pour chaque situation, 6 groupes ont été testés.

Résultats

Les mouches contrôles présentent comme attendu une augmentation du score de mémoire entre 1 et 3 min (Fig. 26B; $t = 2.86$, $P = 0.008$, 10 ddl). A effectif équivalent, les mouches à ailes coupées montrent une légère tendance à augmenter leur score entre 1 et 3 min mais de manière non significative (Fig. 26B; $t = 0.95$, $P = 0.36$, 10 ddl), leurs scores étant plus variables que ceux des mouches contrôles.

Conclusion

Il est donc possible que des sons normalement produits par les ailes soient impliqués dans l'effet de groupe. Cependant, nous ne pouvons pas conclure de manière certaine sur ce point, car l'absence des ailes pourrait avoir une influence sur d'autres modalités que la production de sons, et pourrait constituer un stress influençant l'activité exploratoire durant le test.

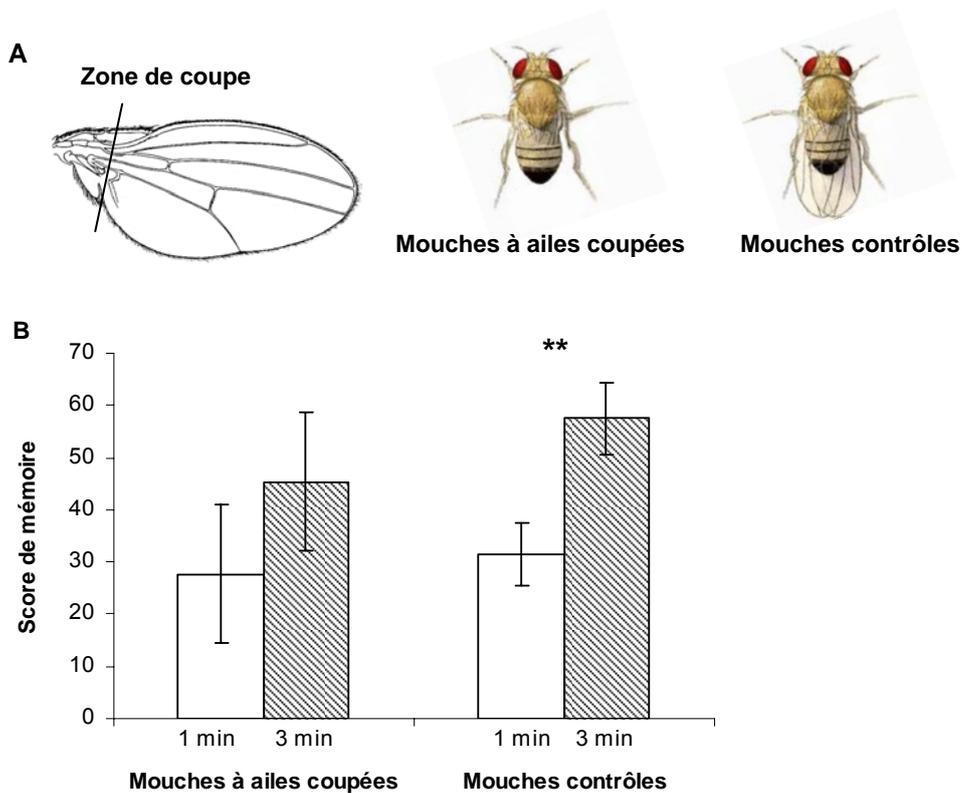


Figure 26: Recherche d'un signal auditif produit par les ailes à l'origine de l'augmentation du score de MRA en groupe entre 1 et 3 min de test.

A. Schéma d'une aile de drosophile et de la zone de coupe des ailes pour les groupes de mouches « à ailes coupées », de manière à supprimer les possibilités de production de sons par les ailes. La coupe a été effectuée 24 h avant le conditionnement sous loupe binoculaire, sur des mouches anesthésié au CO₂ (moins de 40 s) et à l'aide d'une aiguille de seringue. Les mouches contrôles, aux ailes intactes, ont été placées sous anesthésie pendant une durée équivalente. **B.** Comparaison du score de MRA entre 1 et 3 min de test, 24 h après conditionnement massé, pour des groupes de mouches à ailes coupées et des groupes de mouches contrôles (Ns = 6). Le graphique représente le score de mémoire moyen ± l'erreur standard à la moyenne. Les étoiles signalent une différence significative avec une probabilité de * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ou *** $P < 0.001$.

4.4 Implication de signaux olfactifs ?

Certaines communications phéromonales connues chez la drosophile pourraient être impliquées dans l'effet de groupe. Par exemple, la phéromone d'agrégation cVA pourrait être impliquée dans un phénomène d'attraction et d'agrégation entre les mouches (indépendamment du sexe) dans l'odeur non-conditionnée. Il a été également démontré que des mouches stressées produisent du CO₂, et que les congénères le perçoivent via l'olfaction et y répondent par un comportement de fuite (Suh *et al.* 2004). Or la situation de test est une source de stress pour les mouches. Il est donc possible que les mouches produisent du CO₂

notamment lorsqu'elles se trouvent dans la mauvaise odeur, ce qui générerait un comportement d'évitement des congénères dans la mauvaise odeur, et un déplacement vers la bonne odeur. Nous avons donc ciblé cette expérience sur la recherche d'une communication chimique à distance, avec l'hypothèse que les mouches conditionnées envoient des signaux olfactifs soit d'agrégation dans la bonne odeur, soit de répulsion dans la mauvaise odeur.

4.4.1 Test d'attraction sur des mouches conditionnées

Hypothèse

Les mouches conditionnées pourraient produire des signaux olfactifs attractifs perceptibles à distance par d'autres mouches conditionnées, et qui seraient attirées vers les premières.

Protocole

Pour tenter d'observer l'implication de signaux olfactifs percevables à distance, nous avons éliminé d'éventuels signaux visuels et signaux olfactifs de contact, en séparant les mouches testées (réceptrices des signaux) des mouches génératrices de signaux par une cloison dans l'appareil de test. Pour cela, nous nous sommes placés dans une situation habituelle de test, mais en rajoutant des tubes « sources » en amont des tubes de test (Fig. 27A). Après conditionnement massé, les groupes de mouches conditionnées sont divisés en deux et reconditionnés de manière à ce que les groupes de mouches utilisés en source et les groupes testés proviennent pour moitié des mêmes groupes de conditionnement. 24 h après, les mouches « sources » sont placées sur l'un ou l'autre côté de l'appareil de test par alternance, et les mouches au centre sont testées sans les odeurs de conditionnement pour dissocier la réponse potentielle d'attractivité de la réponse conditionnée. De cette manière, nous testons l'hypothèse que les mouches conditionnées « sources » ne sont pas obligées d'être dans l'odeur non-conditionnée pour produire des signaux attractifs, et qu'il leur suffit d'être dans les conditions expérimentales du test en absence de l'odeur conditionnée.

Si les mouches conditionnées envoient des signaux attractifs détectables à distance par d'autres mouches conditionnées, alors les mouches testées devraient se déplacer préférentiellement vers le côté où sont présentes les mouches « sources ». Le score d'attractivité est donc calculé de la même manière que le score de mémoire:

$$\text{Score d'attractivité} = \frac{\text{Nb mouches du côté des mouches « sources »} - \text{Nb mouches du côté sans mouches « sources »}}{\text{Nb total de mouches dans les deux côtés}} \times 100$$

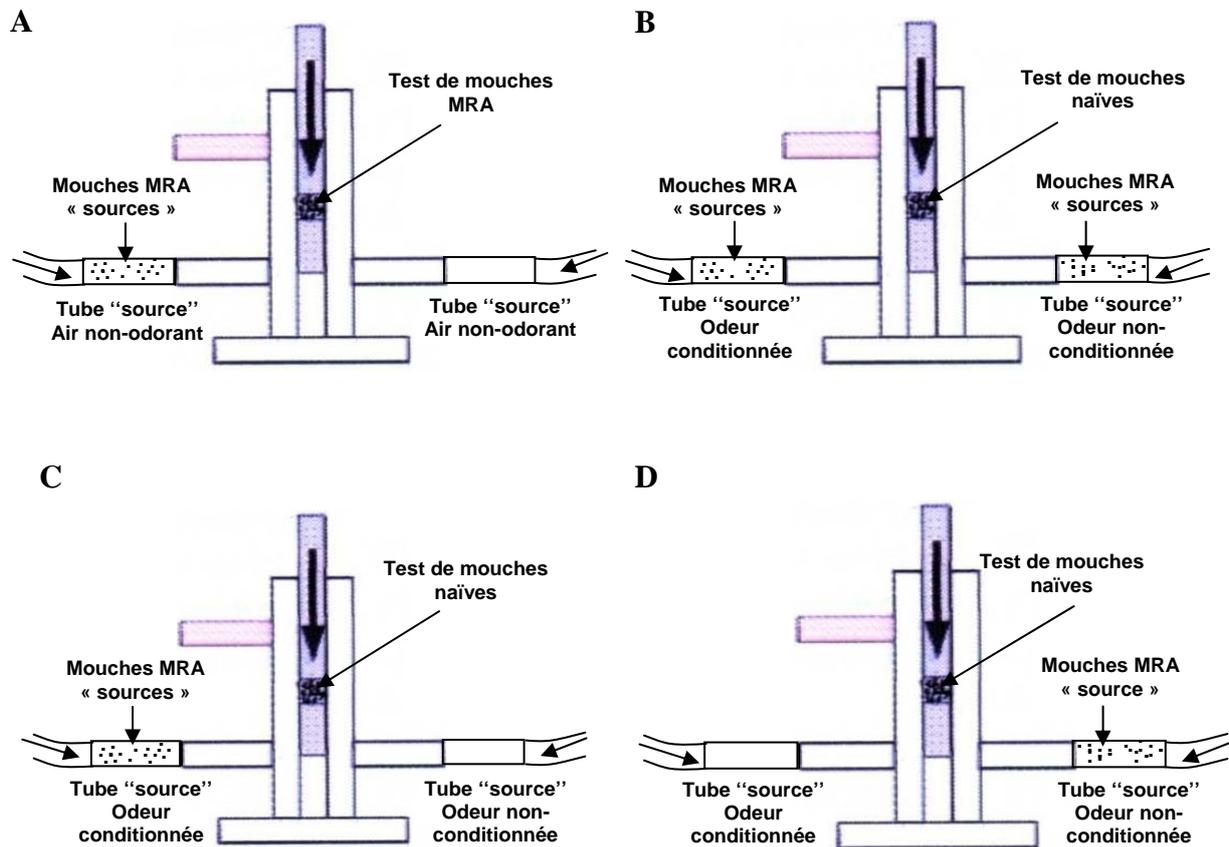


Figure 27: Schéma général de l'appareil de test avec rajout de tubes « sources ». **A.** Test de l'hypothèse de l'attractivité des mouches conditionnées pour d'autres mouches conditionnées (expérience 4.4.1). Les mouches « sources », conditionnées pour la MRA, ne sont présentes que d'un côté (avec alternance), sans les odeurs de conditionnement qui sont remplacées par un flux d'air sans odeur, et les mouches testées au centre sont des mouches conditionnées pour la MRA. **B, C, D.** Tests de l'hypothèse de l'attraction dans l'odeur non-conditionnée et de la répulsion dans l'odeur conditionnée de mouches naïves par des mouches conditionnées (expérience 4.4.2), avec le test des deux hypothèses simultanément (**B**), le test seul de l'attraction dans l'odeur non-conditionnée (**C**), et le test seul de la répulsion dans l'odeur conditionnée (**D**). Les odeurs de conditionnement sont présentes, les mouches « sources » sont placées soit dans les deux odeurs à la fois (**B**), soit du côté de l'odeur non-conditionnée (**C**), soit de l'odeur conditionnée (**D**), et des mouches naïves sont testées au centre. Les flèches en amont des tubes « sources » représentent le sens des flux d'air. Le débit du flux d'air global est ajusté au niveau du débitmètre en aval pour qu'il reste équivalent à la situation habituelle sans tubes sources. Nous avons vérifié la fiabilité de ces conditions expérimentales, sans les mouches « sources », sur la capacité de mémoire de groupes de mouches conditionnées (Score de ARM à 3 min = 36 ± 3 , n=3).

Résultats

Le score d'attractivité de -8 ± 7 n'est pas significativement différent de 0 (Pas de figure; N= 7; $t = 1.19$, $P > 0.20$, 6 ddl). Les mouches conditionnées ne sont donc pas attirées par les autres mouches conditionnées « sources ».

Conclusion

Soit la présence dans l'odeur non-conditionnée (synonyme de sécurité) est nécessaire à la production de signaux attractifs, soit les mouches ne produisent tout simplement pas de signaux attractifs.

4.4.2 Test d'attraction/répulsion sur des mouches naïves

Hypothèse

Nous avons fait l'hypothèse que les mouches conditionnées produisent des signaux olfactifs soit d'agrégation dans l'odeur non-conditionnée, soit de répulsion dans l'odeur conditionnée, et qui seraient perceptibles par des mouches naïves.

Protocole

A l'émergence, des groupes de mouches sont formés. Le lendemain, la moitié des groupes est conditionnée en protocole massé, et l'autre moitié reste naïve.

Le test d'attractivité/répulsion est effectué dans un appareil de test avec rajout de tubes sources (Fig. 27B, C, D), sur les mouches naïves, en les laissant se répartir dans les tubes de test pendant 3 min. Un groupe de mouches conditionnées est placé soit dans les deux tubes sources, soit dans le tube source de l'odeur non-conditionnée, soit dans le tube source de l'odeur conditionnée. Si les mouches conditionnées présentes dans l'odeur non-conditionnée envoient un signal d'agrégation ou/et si les mouches présentes dans l'odeur conditionnée envoient un signal de répulsion, les mouches naïves devraient choisir majoritairement l'odeur non-conditionnée. Le score est donc calculé de la même manière que précédemment, avec comme odeur conditionnée alternativement soit l'octanol soit le méthylcyclohexanol :

$$\text{Score moyen d'attractivité / répulsion} = \frac{\text{Nb mouches dans l'odeur non-conditionnée} - \text{Nb mouches du côté de l'odeur conditionnée}}{\text{Nb total de mouches dans les deux côtés}} \times 100$$

Au total, 6 groupes de mouches naïves ont été testés dans chaque situation, et les mouches sources ont été renouvelées à chaque test.

Résultats (Fig. 28)

Les mouches naïves ne sont pas attirées vers la zone des mouches conditionnées, elles auraient au contraire tendance à l'éviter quelque soit l'odeur où se trouvent les mouches conditionnées, car en effet si on recalcule les scores d'attractivité comme des scores de répulsion et qu'on les pool aux autres scores de répulsion pour augmenter l'effectif, les scores de répulsion deviennent significativement inférieurs à 0 (Score moyen poolé = -17 ± 7 ; $t = 2.38$, $P < 0.05$, 11 ddl).

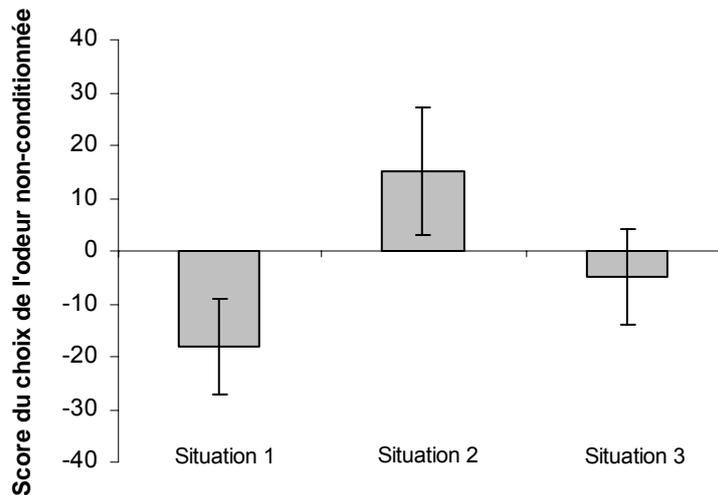


Figure 28: Test d'attraction/répulsion des mouches conditionnées en MRA sur des mouches naïves. Les mouches conditionnées en MRA sont placées en amont des tubes de test, soit dans l'odeur non-conditionnée pour tester l'hypothèse d'un signal d'attraction produit dans l'odeur non-conditionnée (situation 1, Fig. 27C), soit dans l'odeur conditionnée pour tester l'hypothèse d'un signal de répulsion produit dans l'odeur conditionnée (situation 2, Fig. 27D), soit dans les deux odeurs pour tester l'effet cumulé des signaux potentiellement produits en fonction de l'odeur (situation 3, Fig. 27B). Les données représentent la moyenne des scores des mouches naïves testées au centre du l'appareil de test \pm l'erreur standard à la moyenne (N=6).

Ces résultats suggèrent que les mouches conditionnées en MRA produisent des signaux aversifs dans l'odeur conditionnée et non-conditionnée, détectables à distance par des mouches naïves. Ce pourrait donc être des signaux olfactifs liés à un stress du souvenir du conditionnement, du genre du CO₂. Il faudrait cependant vérifier si l'effet répulsif est produit spécifiquement par les mouches conditionnées ou si la simple présence de mouches, même naïves, dans le tube source n'induit pas le même phénomène.

Mais comment expliquer que les mouches conditionnées se comportent différemment dans les deux odeurs si elles y produisent des signaux aversifs de manière similaire ?

Les mouches naïves pourraient ne pas être en état de recevoir ou de répondre aux signaux d'attraction produits par les mouches conditionnées en MRA. Le conditionnement massé pourrait induire chez les mouches cet état de réceptivité et de réponse aux signaux. Il est également possible que ces signaux soient aversifs pour les mouches naïves mais pas pour les mouches conditionnées, chez lesquelles ils induiraient seulement une augmentation de l'attention.

Il serait possible de remplacer les mouches naïves par des mouches conditionnées pour la MRA mais dont la mémoire serait quasiment effacée, suffisamment pour que la réponse conditionnée soit inférieure à celle des mouches conditionnées en 5 cycles à 24 h. Pour

faciliter les expériences, nous avons choisi de conditionner les mouches en 1 cycle et de comparer leur score de mémoire à 24 h avec des mouches conditionnées en 5 cycles, sachant qu'on obtiendrait également de la MRA après un conditionnement en un cycle (Tully *et al.* 1994). Mais de manière étonnante, les scores n'étaient pas différents entre le conditionnement en 1 cycle et 5 cycles (Fig. 29; $t < 0.94$, $P > 0.38$, 7 ddl). Nous ne pouvions donc pas utiliser de mouches conditionnées en 1 cycle (en tout cas à 24 h) pour tester notre hypothèse de suivi entre les mouches conditionnées.

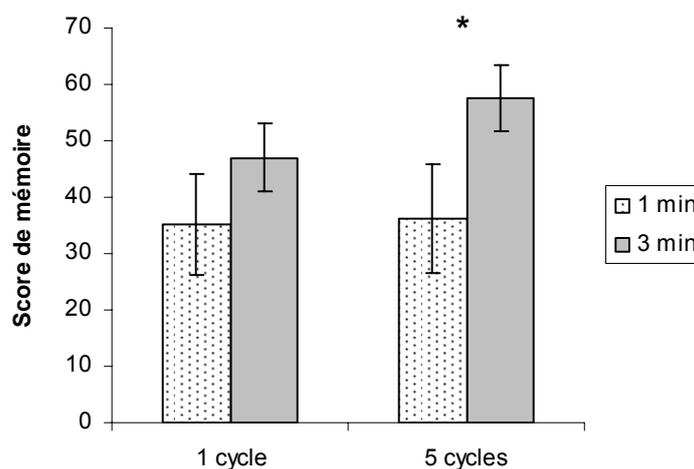


Figure 29: Score de MRA à 1 et 3 min de test obtenu 24 h après un conditionnement aversif en 1 cycle et 5 cycles massés. Les données représentent la moyenne des scores de mémoire \pm l'erreur standard à la moyenne ($n=5$). L'étoile signale une différence significative entre les scores à 1 et 3 min après conditionnement en 5 cycles avec une probabilité de $P < 0.05$.

4.5 Conclusion

Au final, deux hypothèses restent valables:

Hypothèse 1: l'effet de groupe serait en partie dû à une communication active entre les mouches conditionnées avec envoi de signaux spécifiques en fonction de l'odeur où elles sont présentes.

Hypothèse alternative 2: l'effet de groupe impliquerait pleinement de la facilitation sociale du rappel de la mémoire au niveau individuel, sans communication active. La présence des autres mouches offrirait un contexte favorable au rappel et à l'expression de la mémoire individuelle.

De nouvelles expériences sont prévues pour répondre à ces hypothèses, et qui sont en cours de réalisation dans le laboratoire de T. Preat.

**DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. DEVELOPPEMENT DE L'ECP CHEZ LA DROSOPHILE

1.1 Performances des drosophiles en ECP

Nous avons réussi pour la première fois à mettre au point le conditionnement appétitif de l'activité du proboscis à l'odeur de banane chez la drosophile. Les performances observées sont liées à de l'apprentissage associatif, plusieurs expériences démontrant que les réponses à l'odeur sont supérieures chez les mouches conditionnées par rapport aux mouches contrôles.

Les réponses conditionnées obtenues sont cependant moins fortes que les réponses inconditionnées au sucre, que ce soit en pourcentage de réponses ou en amplitude d'extension du proboscis. Nous avons ainsi nommé notre paradigme « activité » conditionnée du proboscis (ACP) plutôt que « extension ». Il n'était pas évident que la drosophile soit capable de répondre à une odeur alimentaire très appétante par l'extension du proboscis. Nous avons montré que les mouches ont une probabilité de réponse d'activité du proboscis plus élevée dans le cas de l'odeur de vinaigre de cidre, équivalente à la probabilité de réponse à l'odeur de banane après conditionnement. L'amplitude de ces réponses étant également faible, nous ne pouvions pas espérer obtenir de plus franches réponses d'extension du proboscis par le conditionnement. Par contre, les tremblements des palpes accompagnant ces légères extensions du proboscis pourraient être un élément important de la réponse conditionnée : en effet, ils pourraient faciliter la détection et la localisation de l'odeur, comme c'est le cas par les mouvements d'antennes chez l'abeille (Lambin *et al.* 2005) et la blatte (Lent *et al.* 2004).

Le pourcentage de réponse reste néanmoins assez faible par rapport à ce qu'on pourrait obtenir avec une réponse d'attraction chez une mouche libre de locomotion, situation plus proche de son répertoire comportemental. En effet dans la nature, elle se dirige à l'odeur vers la source alimentaire (donc en utilisant la locomotion), elle goûte au fur et à mesure le milieu sur lequel elle marche, puis étend le proboscis seulement lorsqu'elle se trouve sur un milieu appétant. Il y a une différence de taille avec les abeilles et les papillons, qui étirent le proboscis pour prélever le nectar des fleurs sans forcément l'avoir goûté au préalable. Chez l'abeille, il a été démontré qu'une simple stimulation mechanosensorielle des antennes pouvait servir de SI dans le cadre d'un conditionnement en ECP (Giurfa et Malun 2004).

L'activité du proboscis était-elle la meilleure réponse appétitive à analyser chez la mouche en contention ? Nous avons observé en expériences préliminaires les comportements de mouches en contention à une autre odeur très appétante (pour la mouche...) de compote de pomme additionnée de levure qu'on avait laissée fermenter pendant 2 jours. En plus de

l'activité du proboscis (tremblement des palpes compris), d'autres comportements avaient été notés comme des signes potentiels d'attention portée à l'odeur chez les mouches en contention, tel que le tremblement des antennes et le changement de posture de la mouche à l'arrivée de l'odeur, avec l'apparition ou l'arrêt de mouvements des pattes visant à la locomotion et le positionnement de la tête qui se relevait vers le flux odorant, alors que les mouches avaient plutôt tendance à la baisser avant l'odeur dans une position d'arrondissement du thorax pour sortir de la contention. Globalement, les drosophiles avaient donc tendance à montrer un changement de comportement à l'arrivée de l'odeur, mais les comportements n'étaient pas systématiquement les mêmes et il était difficile de les interpréter de manière objective. Nous n'en avons donc pas tenu compte.

Les extensions spontanées du proboscis, gênant l'interprétation des réponses d'ACP, semblent être inhérentes au fait que les mouches soient placées en contention. La mouche en contention dirige son activité générale en priorité sur les essais d'évasion du cône. Les mouches présentaient des extensions spontanées surtout lorsqu'elles restaient immobiles, souvent accompagnées de soubressauts réflexes et simultanés des deux pattes antérieures. Cette activité faisait penser à une activité à vide, stéréotypique, visant à se décharger de son énergie dans une activité de substitution à l'activité locomotrice⁴⁵. La contention devait donc induire un état de stress important, non favorable à un apprentissage appétitif.

Plusieurs possibilités d'amélioration du protocole d'ACP peuvent être envisagées. Pour stimuler les tarse avant de donner la récompense sucrée sous le proboscis, il faudrait installer au-dessous des pattes antérieures un petit cylindre rotatif dont une bande serait imbibée de solution sucrée, basé sur celui utilisé pour le conditionnement d'inhibition de l'extension du proboscis (Fig. 4). Le fait de mettre un support sous les pattes antérieures permettrait peut-être aussi de diminuer l'état de stress de la mouche lié à la contention. Le fait de mettre la mouche sur le côté, pour l'observer de profil sous la loupe binoculaire, pourrait également être un facteur de stress supplémentaire, et il serait possible d'y remédier en utilisant un système de miroir pour observer la mouche sous son profil. Sinon, il faudra envisager de mettre au point un autre système de contention potentiellement moins stressant pour la mouche, par exemple avec le système d'attache au niveau du thorax utilisé également pour le conditionnement d'inhibition de l'extension du proboscis (Fig. 4). Il serait également intéressant de modifier le protocole en conditionnement discriminatif, en insérant une seconde odeur non-renforcée ou renforcée avec un renforcement négatif (solution salée ou de quinine), dans le but

⁴⁵ Voir par exemple pour plus d'informations les travaux de Boissy A. (INRA Clermont-Ferrand, département de Physiologie animale et systèmes d'élevage, équipe Herbivores).

d'augmenter le pouvoir associatif *odeur/sucre* contre un éventuel conditionnement visuel *vue du papier/sucre*.

Le conditionnement est assez sensible à l'état de stress physiologique et motivationnel des mouches. Les mouches n'ont plus de réserves glucidiques au bout de 24 h de jeûne à 25°C (Tanimura, com. pers.). Il y a une forte corrélation entre la capacité des mouches à résister au jeûne et la quantité de lipide et de carbohydrate que les mouches stockent. La manière de stocker peut être génétiquement déterminée, avec la possibilité de sélectionner les mouches en fonction de leur résistance au jeûne (Djawdan *et al.* 1998) et l'existence d'un mutant d'un neuropeptide impliqué dans le métabolisme des lipides et du trehalose qui survit plus longtemps que les mouches « sauvages » en condition de jeûne (Isabel *et al.* 2005). Il serait donc intéressant de tester les performances en ACP en fonction de la résistance au jeûne des mouches.

Les résultats sont assez variables en fonction des populations de mouches testées, et sont donc sensibles à la dérive génétique. D'autres souches que *Canton-S* pourraient être testées, comme la souche *Berlin* qui avait donné de meilleurs résultats d'apprentissage dans un conditionnement appétitif de préférence olfactive (Heisenberg *et al.* 1985).

1.2 Recherche des voies nerveuses de l'apprentissage de l'activité conditionnée du proboscis chez la drosophile

La technique d'imagerie calcique serait idéale pour déterminer les sites potentiels d'association entre les informations gustatives et olfactives et visualiser le circuit du rappel de la mémoire. Néanmoins, d'autres techniques génétiques peuvent être envisagées. Par exemple, pour vérifier si les CP sont nécessaires à l'apprentissage, il est possible d'utiliser un mutant des CP ou une souche dont les CP ont été supprimés par traitement chimique, et de comparer les performances d'ACP avec la souche *CS*, et ainsi de suite pour les autres structures nerveuses. Pour savoir si l'olfaction par les palpes maxillaires est primordiale pour faire l'association, nous pourrions comparer les performances de mouches dont les antennes ou les palpes ont été supprimés. Charro et Alcorta (1994) avaient déjà utilisé cette technique d'ablation pour quantifier l'importance relative des palpes maxillaires par rapport aux antennes dans des réponses d'attraction ou d'évitement d'odeurs. Cette hypothèse liée aux palpes maxillaires vient du fait que 1) chez la mouche bleue *Phormia regina*, le réflexe inconditionné d'extension du proboscis n'implique pas à priori de structures nerveuses plus centrales que le SOG, qui traite l'afférence sensorielle gustative et commande directement le réflexe d'extension par innervation des muscles du proboscis (Morita et Shiraishi 1985), et 2) qu'une partie des neurones olfactifs provenant des palpes maxillaires projettent sur la partie postérieure du SOG (Singh et Nayak 1985; de Bruyne *et al.* 1999). Le codage olfactif

provenant des palpes comme des antennes est ensuite acheminé jusqu'aux glomeruli des lobes antennaires (de Bruyne *et al.* 1999; Hallem *et al.* 2004). Il serait nécessaire de rechercher l'implication potentielle du SOG, mais également des lobes antennaires, des calyces des CP et du corne latérale, zones de terminaison synaptique de neurones octopaminergiques reconnues ou suggérées pour être impliquées dans l'ECP chez l'abeille (Hammer 1993; Hammer et Menzel 1998; Schwärzel et Müller 2006).

1.3 Possibilité d'application de l'imagerie calcique

Marella *et al.* (2006) ont utilisé l'imagerie calcique pour visualiser *in vivo* l'activité nerveuse impliquée dans la gustation au niveau du système périphérique. Ils ont utilisé la souche transgénique exprimant l'indicateur calcique G-CaMP, spécifiquement dans le SOG grâce au système génétique Gal4-UAS. Cette souche serait à utiliser dans le cadre de l'imagerie *in vivo* en ECP, en faisant varier les sites d'expression de l'indicateur calcique à l'aide des lignées Gal4 existantes.

Il faudrait essayer le conditionnement d'ECP sur des mouches en contention dont on a ôté la calotte crânienne, et visualiser les zones nerveuses actives rapidement après conditionnement.

Les extensions du proboscis (spontanées et conditionnées) constituent une limite à l'application de l'imagerie *in vivo* durant le conditionnement. Chez la drosophile comme chez l'abeille, les mouvements du proboscis induisent des mouvements du cerveau qui limitent la visualisation de l'activité nerveuse par imagerie. En général chez l'abeille, le proboscis est sectionné juste après le conditionnement et une « réponse conditionnée » nerveuse est mesurée au niveau de neurones contrôlant normalement l'extension du proboscis (Faber *et al.* 1999). Si cette situation permet d'obtenir des « réponses conditionnées » chez l'abeille, chez qui par ailleurs le conditionnement d'ECP est très robuste, il n'est vraiment pas évident que ce soit le cas chez la drosophile, dont le conditionnement est sensible au stress de l'expérience. Un nouveau type de conditionnement chez l'abeille en contention a été développé récemment, le conditionnement olfactif aversif de l'extension du dard, qui associe l'odeur conditionnée avec des chocs électriques (Vergoz *et al.* 2007). Ainsi il est possible de visualiser l'activité nerveuse par imagerie et la réponse comportementale conditionnée simultanément (Roussel *et al.* 2007).

II. CONDITIONNEMENT APPÉTITIF DE LA PRÉFÉRENCE OLFACTIVE EN GROUPE

2.1 Rôle de la répétition de l'apprentissage dans la mémoire appétitive à long-terme

Si les résultats d'ECP sont plus ou moins convaincants sur les capacités d'apprentissage et de mémoire appétitive chez la mouche *Drosophila melanogaster*, ceux du conditionnement de l'attractivité ne font plus de doute. La drosophile montre de très bonnes capacités d'apprentissage et de mémoire appétitive avec les paramètres de jeûne et le renforcement utilisé, et ce jusqu'à au moins 3 jours.

Par comparaison avec les capacités d'apprentissage aversif, les trois types de conditionnement en 1 cycle, 5 cycles massés et 5 cycles espacés produisent de la mémoire consolidée dépendante de la synthèse protéique, mesurée à 22h. Les mécanismes liés à l'apprentissage et aux phases de mémoire appétitive et aversive ne sont donc pas similaires. Pour former de la MLT aversive et de la MLT d'une manière générale, il est considéré qu'un apprentissage répété est nécessaire.

Durant un cycle de conditionnement appétitif, consistant en 1 min d'exposition au sucre et à l'odeur, il est possible que la drosophile fasse plusieurs fois l'association entre l'odeur et les différentes prises alimentaires. Mais cela n'explique pas la différence existant avec le conditionnement aversif, où la drosophile est également censée faire plusieurs fois l'association entre l'odeur et les chocs électriques présentés 12 fois et toutes les 5 secondes durant la minute du cycle de conditionnement. Il y a une nette différence cependant entre ces deux types de conditionnements « intensifs »: le premier, appétitif, s'apparente en partie à un conditionnement opérant car la mouche doit se déplacer vers la zone de stimulation sucrée pour percevoir le renforcement et elle est libre de décider quand prendre la nourriture, alors qu'elle subit les chocs électriques sans pouvoir les éviter dans le second. Néanmoins, le paradigme de conditionnement appétitif est également de type pavlovien si on considère que ce n'est pas la mouche qui doit choisir d'aller dans un compartiment plus qu'un autre pour obtenir le renforcement et que l'odeur est présente quelque soit le comportement de la mouche. Il a déjà été fait état de situations similaires où les conditionnements classique et opérant sont mixtes (Dudai 1989b). La mouche pourrait donc faire l'association entre son action de recherche alimentaire et l'odeur conditionnée, suggérant l'existence de points de convergence entre le comportement opérant, le renforcement appétitif et le stimulus olfactif (voir pour revue Brembs 2003) et l'implication de différentes voies moléculaires⁴⁶ (Brembs et Plendl 2008).

⁴⁶ Dans le conditionnement opérant, la Protéine Kinase C est impliquée dans l'apprentissage et non dans le stockage de la mémoire, et le mutant *rutabaga* n'est pas mutant d'apprentissage (Brembs et Plendl 2008).

Avec ce type de conditionnement et le fait que les passages entre les compartiments avec et sans renforcement sont fluides et sans secousses, notre paradigme de conditionnement appétitif doit représenter pour la mouche une situation d'apprentissage adaptée à son répertoire comportemental et relativement proche de ce qu'elle pourrait expérimenter dans la nature, comparé au conditionnement aversif.

Il existe d'autres exemples de formation de MLT après un seul cycle de conditionnement chez d'autres espèces vertébrées et invertébrées (pour brève synthèse, voir la discussion de l'article de Krashes et Wadell 2008). A l'exception du conditionnement du stress chez les rongeurs, la plupart implique des paradigmes de conditionnement appétitif et gustatif⁴⁷, et il a été suggéré que l'importance innée du comportement de recherche alimentaire pourrait être à l'origine de la consolidation rapide de la mémoire appétitive (Krashes et Wadell 2008).

2.2 Mécanismes de formation de la MLT appétitive et perspectives du projet

Krashes et Waddell (2008) ont publié (juste avant notre article...) des résultats concernant la formation d'une mémoire dépendante de la synthèse protéique 24 h après un seul cycle de leur conditionnement appétitif. Ils ont montré que cette MLT appétitive se consolide durant les 2 h suivant l'apprentissage, que cette consolidation doit se faire dans les neurones des lobes $\alpha'\beta'$ et DPM des CP, qu'elle est dépendante de la voie de l'AMPC et du système CREB dans les CP (comme c'est le cas pour la MLT aversive), que les mutants de MLT aversive *crammer* et *tequila* sont également déficients pour cette MLT appétitive, mais qu'elle doit également être dépendante de la protéine Radish, connue jusqu'à présent pour n'être impliquée que dans la MRA dans le paradigme de conditionnement aversif.

Cependant, il est nécessaire de vérifier si le défaut de mémoire du mutant *radish* est corrélé à un défaut de réponse au sucre, comme nous l'avons montré pour les performances d'apprentissage en fonction de la durée de jeûne (Fig. 2 art.2), et pour le mutant *crammer* (Table 1 art.2). Notre défaut de MCT du mutant *crammer* est contradictoire avec les résultats de MMT normale dans l'étude de Krashes et Waddell (2008). Nous avons montré que le défaut de réponse au sucre de *crammer* n'est plus visible après un test moins sensible, utilisant une solution de sucre plus concentrée. Leur résultat de MMT normale pourrait être lié à leur cycle de conditionnement plus long (2 min au lieu de 1 min dans le nôtre) et potentiellement à une différence de quantité de sucre disponible pour le renforcement.

⁴⁷ De manière surprenante, le conditionnement ECP en un cycle chez l'abeille permet d'obtenir une mémoire robuste mais qui ne nécessite pas de nouvelles synthèses protéiques. Par contre, le conditionnement massé produit de la MLT (Menzel *et al.* 2001).

Nos résultats montrent que les mémoires produites par les conditionnements en un cycle et cinq cycles massés sont moins durables qu'après un conditionnement espacé, avec une différence significative à 3 jours (Fig. 4 art.2). Il faudra donc rechercher les différences entre les mécanismes des MLT formées à partir des différents conditionnements, au niveau qualitatif et quantitatif. Il sera également intéressant de comparer les processus impliqués chez l'abeille et la drosophile. En ECP chez l'abeille, plusieurs types et phases de mémoire durable sont formés en fonction des conditionnements utilisés, mais seul les conditionnements répétés permettent d'obtenir de la MLT, dépendante de la synthèse protéique *de novo*, à part lorsqu'on prolonge artificiellement l'activité de la protéine kinase A dans les lobes antennaires après le conditionnement en un cycle (pour revue, voir Menzel *et al.* 2001; Schwärzel et Müller 2006).

Enfin, dans le cadre de la recherche des mécanismes du rappel de la mémoire, il faudra caractériser les comportements relatifs à la réponse conditionnée en individuelle et en groupe, ce qui permettra de caractériser les différences de réponses liées aux trois types de conditionnement et chercher l'existence potentielle d'effets de groupe sur la performance de mémoire appétitive, comme cela a été fait pour le conditionnement aversif durant ma thèse.

L'apprentissage et le rappel de la mémoire sont sensibles à l'état de faim (Krashes et Waddell 2008) et la drosophile retient peut-être plus facilement l'appétitivité d'une odeur lorsque le renforcement ne lui est pas imposé (comme dans le cadre de l'ECP) mais qu'elle répond par elle-même à son besoin de nourriture. Il semble qu'il existe un ou des systèmes neuromodulateurs chez la drosophile reflétant la motivation à apprendre et à répondre, par exemple en mobilisant l'attention, et qui moduleraient l'efficacité du cheminement nerveux de la perception des informations de l'environnement jusqu'à la prise de décision induisant la réponse comportementale. Il a déjà été proposé un circuit d'interneurones (*hug* neurons) potentiellement impliqué dans la modulation du comportement de nourrissage en fonction de l'état de jeûne chez la drosophile à l'état larvaire et adulte, et dont l'organisation au niveau du cerveau central est similaire aux deux stades (Melcher et Pankratz 2005).

2.3 Généralisation des processus mnésiques pour différents contextes négatifs ou positifs

Un ensemble d'études indépendantes permet de considérer que les deux voies nerveuses distinctes à la base des conditionnements pavloviens olfactifs aversifs et appétitifs (respectivement les neurones dopaminergiques et octopaminergiques des CP), ont des fonctions conservées dans l'évolution, avec des résultats similaires chez la drosophile (Schwaerzel *et al.* 2003), chez l'abeille (Hammer et Menzel 1998; Hammer 1993; Menzel *et al.* 1999; Vergoz *et al.* 2007) et chez le grillon (Unoki *et al.* 2005, 2006). Cette distinction

n'est cependant pas très claire chez la drosophile, sachant que le récepteur dopaminergique D1 présent dans les CP, impliqué dans l'apprentissage aversif, l'est également dans l'apprentissage appétitif (Kim *et al.* 2007b).

Il serait intéressant d'étudier si les neurones dopaminergiques des CP répondent de manière générale aux stimuli aversifs ou spécifiquement au renforcement par choc électrique. Par exemple, il faudrait le vérifier avec les conditionnements aversifs utilisant les chocs mécaniques et thermiques⁴⁸, et dans un paradigme de conditionnement aversif lié à l'alimentation. Il est possible par exemple d'utiliser le système du barillet de conditionnement appétitif en remplaçant la solution sucrée par un renforcement aversif (solution salée ou de quinine) comme utilisé dans le cadre du conditionnement d'inhibition conditionnée de l'extension du proboscis (DeJianne *et al.* 1985), ou par un produit comme le chlorure de lithium conduisant à une aversion alimentaire par malaise gastrique. Il serait également intéressant de vérifier si les neurones octopaminergiques répondent de manière spécifique aux renforcements appétitifs, ou de manière plus générale à d'autres récompenses non appétitives, comme dans le cas du conditionnement « backward » où l'odeur présentée après le choc électrique devient source d'apaisement pour la mouche (Tanimoto *et al.* 2005).

Une approche est déjà actuellement menée dans ce sens chez le grillon *Gryllus bimaculatus*, pour vérifier l'implication des récepteurs dopaminergiques et octopaminergiques dans le cadre de conditionnements olfactifs et visuels avec des renforcements appétitifs et aversifs différents (eau et solution salée; Unoki *et al.* 2005, 2006).

III. PERFORMANCES INDIVIDUELLES ET EN GROUPE DE LA MEMOIRE D'UNE ODEUR AVERSIVE

3.1 Caractérisation de la réponse conditionnée individuelle pour la MLT et la MRA

Dans le cadre du conditionnement olfactif aversif par choc électrique, la MRA apparait comme une mauvaise mémoire et la MLT comme une bonne mémoire dans l'analyse des performances individuelles. La réponse conditionnée liée à la MRA se caractérise tout d'abord par une certaine latence du rappel de la mémoire, avec un premier choix aléatoire des odeurs, puis par une plus grande probabilité de quitter la mauvaise odeur que la bonne après y être entré et par un temps de locomotion plus important dans la mauvaise odeur que dans la bonne. Ces deux caractéristiques s'amenuisent vite au cours du test et ne seront plus significatives lors des prochains passages dans la mauvaise odeur, suggérant un phénomène d'extinction plus précoce pour la MRA que pour la MLT, dans le cas du test individuel. Le

⁴⁸ Voir dans l'introduction, la partie 6.4.1 « Conditionnements olfactifs aversifs (choc électrique, mécanique ou thermique) ».

premier choix aléatoire de l'odeur semble être le reflet d'une déficience de la mémoire (synonyme de l'oubli), mais il pourrait également être lié à un manque d'attention aux odeurs au début du test. Son influence sur le score final des mouches est importante puisque un nombre non négligeable de mouches ne quittent jamais la première odeur dans laquelle elles sont entrées.

La réponse conditionnée liée à la MLT est plus robuste et dynamique, avec un premier choix conditionné dès la sortie de la logette, une forte probabilité de quitter la mauvaise odeur après y être entré même plusieurs fois, et par un temps de locomotion plus important dans la mauvaise odeur que dans la bonne, caractéristique qui ne s'amenuise pas durant les 3 min de test.

La différence de locomotion et d'exploration entre l'odeur conditionnée et non conditionnée est un paramètre intéressant de la réponse conditionnée, qui permet de savoir si la mouche reconnaît le caractère conditionné ou non de l'odeur dans laquelle elle se trouve. Le paramètre de locomotion permet donc de nuancer l'interprétation binaire des performances liées à la simple présence de la mouche dans une des deux odeurs. Dans le cas de la MRA, le fait de percevoir que la première odeur qu'elles ont choisie est la mauvaise ne suffit pas aux mouches pour qu'elles prennent la décision de changer d'odeur. La MLT et la MRA induisent des comportements exploratoires différents, avec un dynamisme visible par une plus grande fréquence de passages entre les deux odeurs pour la MLT et au contraire une exploration plus profonde du tube de la mauvaise odeur pour la MRA.

Les déplacements sont certainement plus contraints dans l'appareil de test en T que dans l'olfactomètre à 4 voies, et il faudrait vérifier si les caractéristiques de l'activité exploratoire liées à la MLT et la MRA sont similaires dans l'olfactomètre à 4 voies.

Il serait intéressant de visualiser et d'analyser les trajectoires et la vitesse des déplacements, en utilisant un enregistrement vidéo et un système de video-tracking et d'analyse d'image, tel que le système d'analyse d'image dynamique DIAS déjà utilisé chez la drosophile (Solltech, Oakdale, IA; voir Rodan *et al.* 2002; Wolf *et al.* 2002). Le problème potentiel d'un tel système est qu'il faudrait l'adapter à notre environnement expérimental peu lumineux. Ce problème serait résolu si on pouvait utiliser une technique de radio-marquage des individus, mais les outils de marquage disponibles à l'heure actuelle ne sont pas encore assez miniaturisés pour le modèle drosophile (Sempo *et al.* 2007). Ce système serait d'autant plus intéressant qu'il permet de suivre de manière fiable plusieurs individus à la fois dans un groupe, et que nous pourrions l'utiliser pour étudier les mécanismes des effets du groupe sur la MRA et la MLT.

3.2 Effet positif du groupe pour la MRA et négatif pour la MLT

Le test en groupe montre que les interactions entre les individus limitent l'expression du choix conditionné dans le cas de la MLT. Il pourrait s'agir d'une réaction à la gêne physique des mouches entassées dans la logette au départ, puis au cours du test d'une répulsion entre les mouches qui empêcherait certaines d'aller dans la bonne odeur. Dans le cas de la MRA au contraire, les interactions entre les individus sont bénéfiques à l'expression de la réponse conditionnée. Les interactions semblent donc être de types différents par rapport aux mouches entraînées pour la MLT. Il pourrait y avoir moins de répulsion entre les mouches, par exemple par un phénomène de contrôle de l'agressivité et de rapprochement entre les mouches dans la bonne odeur comme décrit par Kamyshev *et al.* (2002).

Les conditionnements massé et espacé semblent induire une sensibilité différente des mouches à leurs congénères durant le test, avec le développement d'interactions « positives » dans le cas de la MRA, et d'interactions « négatives » dans le cas de la MLT. Le fait d'avoir une bonne mémoire individuelle n'est peut-être pas une situation favorable pour que les mouches instaurent ces comportements sociaux positifs.

3.3 Perspectives expérimentales

On pourrait faire varier le nombre de mouches testées en groupe, pour estimer l'influence de la quantité des interactions sur les deux effets antagonistes du groupe et déterminer les quantités optimales de mouches nécessaires à l'obtention des meilleures performances de groupe de MLT et de MRA.

Concernant la recherche des mécanismes de l'effet positif du groupe, une expérience devrait permettre de répondre clairement s'il s'agit pleinement de facilitation sociale du rappel de la mémoire ou de facilitation sociale sans lien direct avec l'utilisation de la mémoire (agrégation passive ou communication active spécifique entre les mouches ARM). Cette expérience consiste à mélanger un groupe de mouches conditionnées en 5 cycles massés pour l'odeur OCT à un second groupe conditionné pour l'odeur MCH. Ainsi, soit les groupes ont un moins bon score que si ils étaient conditionnés pour la même odeur, et donc l'hypothèse d'une facilitation sociale non liée à la mémoire serait validée, soit au contraire les scores sont semblables, et l'hypothèse de la facilitation sociale du rappel de la mémoire serait vérifiée.

Pour analyser l'impact de l'olfaction sur l'effet de groupe, nous ne pouvons pas utiliser de mutants de l'olfaction générale, du fait de la nature olfactive du conditionnement.

Si l'hypothèse de la communication active était validée, il serait intéressant d'étudier plus spécifiquement les hypothèses de l'implication de la phéromone d'agrégation cVA et/ou du CO₂ comme potentiel signal d'alarme. Pour la cVA, nous aurions pu utiliser des mutants spécifiques de sa perception. Mais les mutants *tod1* (Tone-déficient) et *tot1* (T-

onetransformed), dont les sensilles sensorielles portant le récepteur de la phéromone sont absentes, possèdent des défauts de locomotion qui ne permettent pas de les utiliser dans des études comportementales (Ha et Smith 2006). Pour le CO₂, il serait envisageable d'utiliser des mutants spécifiques de sa perception, Jones *et al.* (2007) ayant démontré que la perception du CO₂ passe par deux récepteurs chimiosensoriels présents sur les antennes (*Gr21a* et *Gr63a*), et que la perte de fonction d'au moins un de ces deux récepteurs chez les mouches mutantes induisait la perte de la sensibilité au CO₂ et du comportement d'évitement associé.

D'autres expériences sont encore envisagées, pour savoir par exemple si les interactions à l'origine de l'effet de groupe sont produites spécifiquement par des mouches entraînées pour la MRA ou si les mouches entraînées pour d'autres types de mémoire (MLT, MCT...) sont capables de les produire aussi (même si elles ne les utilisent pas elles-mêmes dans le cadre de la réponse conditionnée). Dans ce cas, si une mouche conditionnée pour la MRA est mélangée à un groupe de mouches conditionnées pour la MLT, elle devrait avoir un meilleur score individuel que si elle était testée seule, et un aussi bon score que si elle était mélangée à un groupe de mouches conditionnées pour la MRA.

Il est prévu de réaliser certaines de ces expériences prochainement dans le cadre de la révision de l'article n°2.

Enfin on peut se demander également de quelle manière l'effet de groupe est spécifique de la mémoire de type MRA. Apparaît-il spécifiquement après un conditionnement massé, ou pourrait-on l'observer après un conditionnement en un seul cycle ? Les résultats de l'article n°4 montrent des similarités entre la réponse conditionnée individuelle pour la MMT obtenue après un conditionnement en un cycle (sachant que la performance mesurée à 1-2h correspond à un mélange de MMT et de MRA; Tully *et al.* 1994) et pour la MRA obtenue après un conditionnement massé. De même, nous avons observé que la performance de groupe obtenue 24 h après le conditionnement en un cycle pouvait être similaire à celle obtenue avec le conditionnement massé (Fig. 29), même si il est reconnu en général que la mémoire après conditionnement massé est supérieure. Il est donc possible qu'un effet positif du groupe existe aussi pour la MRA obtenue après un cycle de conditionnement, et cela reste à vérifier par une expérience comparant la performance individuelle à la performance de groupe.

Il faudrait également vérifier si le simple fait d'avoir une mauvaise mémoire individuelle ne serait pas un contexte suffisant et favorable à l'instauration des comportements sociaux à l'origine de l'effet positif du groupe. Pour la MLT, il faudrait se placer à un délai plus important entre le test et le conditionnement, à un moment où le score de MLT individuel est devenu assez bas et le comparer avec le score en groupe. Une expérience préliminaire a été réalisée durant la thèse pour la mémoire à 4 jours. Le score individuel de durée (n=48 mouches) augmentait jusqu'à 30 ± 9 et le score en groupe (n=4) à 21 ± 7 à 3 min de test.

3.4 Contribution des résultats pour les investigations de la mémoire chez la drosophile

Nos résultats sur les performances individuelles de mémoire confirment les capacités individuelles de mémoire de la drosophile dans le cadre d'un paradigme de conditionnement où les mouches avaient toujours été manipulées en groupe.

Le test en individuel permet d'évaluer les capacités de mémoire différemment du test en groupe et apporte des données nouvelles sur la réponse conditionnée. Quand la mémoire est efficace, mesurée à court terme et jusqu'à 24h pour un conditionnement espacé, le test en individuel et le test en groupe ont tendance à présenter des scores équivalents. La performance de mémoire mesurée en groupe reflète donc bien les capacités individuelles de mémorisation lorsque celles-ci sont bonnes, probablement par le biais d'un effet plafond. Par contre, lorsque la mémoire devient moins efficace (comme observé avec le test individuel de la MRA à 24h et avec le test en groupe de la MLT à 48h), test en groupe et test individuel ne sont plus équivalents, suggérant que les mouches sont plus sensibles aux interactions avec leurs congénères lors du test en groupe, avec deux effets opposés en fonction du type de mémoire.

Le test individuel ne reflète pas forcément mieux l'efficacité de la mémoire que le test en groupe, il semblerait au contraire que les résultats des deux tests se complètent. Dans le cas de la MLT, le test en individuel refléterait l'efficacité du stockage de mémoire et, par comparaison, le test en groupe un certain niveau de déficience du rappel de la mémoire. Mais dans le cas de la MRA, soit on considère 1) que l'effet positif du groupe est dû pleinement à de la facilitation du rappel de la mémoire, et donc le test en groupe refléterait l'efficacité du stockage de mémoire et le test individuel un certain niveau de déficience du rappel de la mémoire, 2) soit que l'effet positif du groupe n'est pas lié au rappel de la mémoire mais à une réponse de suivi des mouches, et donc le test en individuel refléterait un certain niveau de déficience de stockage de la mémoire, et le test en groupe une capacité à interagir socialement pour adapter la réponse comportementale.

La découverte de l'influence du groupe sur les performances de mémoire nécessite de prendre en compte les effets potentiels des tests individuels et en groupe pour la recherche des mutants de mémoire, dont la performance pourrait être influencée par les interactions sociales. Il serait intéressant de tester leurs performances individuelles pour mieux caractériser leurs déficiences, et ce également pour les mutants d'apprentissage et de mémoire déjà connus (*rutabaga*, *dunce*, *amnesiac*, *radish*, *crammer*, *tequila*, etc...).

3.5 Recherche des mécanismes du rappel de la mémoire

D'une manière générale, nos résultats montrent que la diminution de l'efficacité de la mémoire semble se caractériser au moins dans un premier temps par l'augmentation de la latence du rappel. Ainsi la réponse conditionnée en MRA n'apparaît qu'après le premier choix

olfactif du test en individuel et le score de groupe atteint son maximum avec une latence de 2 min dans les expérimentations présentées dans ce mémoire⁴⁹. De même le score individuel de MLT à 48h atteint moins rapidement le score maximum au cours des 3 min de test qu'à 24h (données non présentées). Ces résultats comportementaux suggèrent que l'oubli chez la drosophile passerait d'abord par une déficience du rappel de la mémoire et non par un effacement de la mémoire en elle-même, comme cela a déjà été proposé par exemple chez le rat et l'homme (Warrington et Weiskrantz 1968; de Hoz *et al.* 2004). Au niveau neurologique, il serait intéressant d'analyser les capacités mnésiques de la mouche en termes de vitesse de traitement des informations au niveau des zones cérébrales impliquées dans le rappel.

Pour identifier les circuits du rappel impliqués dans l'effet de groupe de la MRA, il serait possible d'utiliser le système Gal4/uas associé à la protéine Shibire pour bloquer certains centres neuronaux et observer les conséquences sur la performance de groupe.

L'analyse de la réponse conditionnée en individuel montre que les deux formes de mémoire MRA et MLT induisent clairement des réponses comportementales différentes, et suggèrent donc des mécanismes de rappel différents. Il a été déjà démontré que les neurones sortant des lobes α/β des CP étaient des zones potentielles du rappel pour les mémoires obtenues 3 h après conditionnement (MMT et période de stabilisation de la MRA) (McGuire *et al.* 2001; Isabel *et al.* 2004; Krashes *et al.* 2007). Il reste à explorer les voies du rappel de la MLT et de la MRA à plus long terme, en supposant qu'elles peuvent être différentes entre elles et de celles à plus courts termes.

Au niveau du/des centre(s) nerveux de la prise de décision, il faudra rechercher aussi l'existence d'interférences nerveuses modulant le rappel, reliées aux afférences de la perception de l'environnement social, des émotions ou du stress. Chez le rat, plusieurs systèmes nerveux, dont les amygdales, jouent ce rôle de modulateurs sur le rappel, et certaines hormones de stress (adrenaline, β -endorphin et adrenocorticotropin), à doses modérées, sont connues pour favoriser le rappel (pour revue, voir Cammarota *et al.* 2004).

3.6 MRA et MLT: deux mémoires exclusives ?

Le fait que la MRA et la MLT induisent des réponses comportementales différentes nous paraissait en accord avec le modèle d'exclusivité des deux formes de mémoire (Isabel *et al.* 2004; Fig. 10B), comme mentionné dans la discussion de l'article n°3. Toutefois, pour rester objectif, il est nécessaire de ne pas exclure le modèle de coexistence des mémoires (Tully *et*

⁴⁹ Cette durée de latence pour le score de groupe a tendance à varier: dans certaines expérimentations réalisées à l'ESPCI et non présentées dans ce mémoire, le score de groupe avait déjà atteint son plateau à 1 min. Pour la suite de la recherche des mécanismes de l'effet groupe, il est donc préférable de se baser sur la comparaison des performances individuelles et en groupe, et non sur l'augmentation du score de groupe entre 1 et 3 min.

al. 1994; Fig. 10A) et d'analyser dans quelles mesures nos résultats pourraient concorder avec ce modèle.

Dans notre étude de la réponse conditionnée individuelle, même si on considère que de la MRA était encore présente après le conditionnement espacé, la nette différence de robustesse de la réponse conditionnée individuelle serait forcément dûe à la présence de la MLT. A 24 comme à 48h, l'effet positif du groupe lié à la MRA n'apparaît pas dans les performances obtenues après le conditionnement espacé. Au contraire, le score en groupe diminue entre 24 et 48h mais pas le score individuel, ce qui montre que les interactions produites entre les mouches ont toujours tendance à gêner l'expression de la réponse conditionnée. Les interactions « négatives » associées à la MLT pourraient être dominantes par rapport aux interactions « positives » associées à la MRA.

A part les travaux de Isabel *et al.* (2004) et de Mery *et al.* (2007) en faveur du modèle d'exclusivité, l'ensemble des travaux actuels ne permettent pas de trancher sur la question. Les détracteurs de ce modèle se basent sur des expériences où le fait d'inhiber la formation de la MLT n'annule pas le score mais le réduit de moitié, à une valeur similaire à ce qu'ils obtiennent après un conditionnement massé (voir par exemple Lu *et al.* 2007). Une autre expérience phare sur laquelle ils se basent consiste à donner du CXM au mutant *radish* pour un conditionnement espacé, sachant que le traitement CXM inhibe la formation de la MLT et diminue le score de moitié (sachant que la synthèse protéique est réduite de moitié), et que la mutation *radish* induit une déficience de la MRA, ce qui donne au final un score nul (Tully *et al.* 1994). Dans les deux cas d'expériences, cela suggère effectivement qu'il y a de la MRA après le conditionnement espacé, lorsque la MLT est déficiente. Mais ce résultat est également valable dans le cadre du modèle d'exclusivité, où l'absence de formation de la MLT lève l'inhibition de la MRA. On pourrait également imaginer un troisième modèle intermédiaire où de la MRA est encore stockée après un conditionnement espacé, mais où son rappel est récessif par rapport à celui de la MLT, dont le rappel serait plus rapide et plus efficace. Pour prendre en compte les résultats d'Isabel *et al.* (2004) dans ce modèle, on peut imaginer que la MLT bloquerait la MRA non au niveau de son stockage (Isabel *et al.* 2004) mais au niveau de son rappel. Dans ce cas, la mouche pourrait puiser dans sa MRA si sa MLT est déficiente.

Un moyen de vérifier l'hypothèse de présence du stockage de la MRA après le conditionnement espacé serait peut-être de visualiser si des zones cérébrales strictement impliquées dans le stockage de la MRA à 24 h (s'il en existe) sont également actives après le conditionnement espacé, avec les méthodes déjà utilisées pour la MCT et la MMT (Keene *et al.* 2004, 2006; Yu *et al.* 2005; Krashes *et al.* 2007). Il est déjà connu que la performance

après conditionnement espacé nécessite la présence des lobes verticaux α des CP, alors que ceux-ci ne sont pas indispensables pour la performance de la MRA (Pascual et Preat 2001).

IV. LA DROSOPHILE: UN MODELE D'ETUDE DE L'EVOLUTION DE LA SOCIALITE

4.1 Des situations de stress comme force conductrice de l'évolution des comportements sociaux

Il a plusieurs fois été suggéré que des conditions environnementales hostiles (prédation et compétition entre différents règnes biologiques) pourraient être une force conductrice de l'évolution des comportements sociaux (Wilson 1975; Rohlf 2005).

Notre étude a mis en évidence un bénéfice de l'environnement social sur des mouches *CS* dans une situation de rappel de la mémoire d'un danger. Pourrions-nous réellement trouver un tel bénéfice dans la situation de rappel de la mémoire appétitive chez la drosophile ? La question reste ouverte. Un autre exemple récent de bénéfice de l'environnement social a été découvert pour augmenter la durée de vie d'un mutant à vie habituellement courte, le mutant *Sod* (Ruan et Wu 2008). Ce mutant augmente sa durée de vie par augmentation de son activité physique et locomotrice, et de sa résistance au stress lorsqu'il est maintenu en présence de mouches « sauvages » (à durée de vie normale), grâce aux interactions sociales produites avec ces mouches normales. Il n'a pas été retrouvé de bénéfice similaire chez d'autres souches de mouches, incluant la souche *CS* (Ruan et Wu 2008).

Une fois encore, ces deux exemples montrent des bénéfices de l'environnement social dans des situations de stress ou de besoins vitaux.

4.2 Rapprochement vers les notions d'« apprentissage social » et de performance de « mémoire collective »

Le terme générique d'apprentissage social détermine un niveau de performance comportementale qu'un apprentissage individuel ne peut permettre d'atteindre dans bien des cas. Les apprentissages sociaux peuvent prendre des formes diverses (facilitation sociale, apprentissage par observation, imitation) et reposent sur des processus motivationnels et cognitifs de nature et de degré variés⁵⁰. Les apprentissages sociaux existent dans un grand nombre d'espèces animales, où les individus tirent des avantages de la vie sociale face à diverses situations et maintiennent leur fitness à plus faible coût que par l'expérience

⁵⁰ Voir définition donnée par la *Société Française pour l'Etude du Comportement Animal* (SFECA) à l'occasion de son 41^{em} colloque « Le social dans tout ses états » (18-20 avril 2007).

individuelle, comme par exemple dans le cas des stratégies de recherche alimentaire ou de défenses face à un prédateur (voir pour revue Chittka & Leadbeater 2005). L'apprentissage social n'est plus réservé aux vertébrés et aux insectes coloniaux, comme l'a démontré une étude sur le grillon des bois (Coolen *et al.* 2005). Nos résultats vont également dans ce sens. Ils montrent que la drosophile peut dépasser le besoin d'avoir une bonne mémoire individuelle en se servant des informations sociales pour adapter son comportement. En terme de fitness, la MRA constitue une forme de mémoire moins coûteuse en énergie que la MLT pour l'individu, et la réponse collective présente une performance similaire à celle obtenue avec de la MLT. La MRA pourrait donc être un cas d'apprentissage social dans son sens général. Il reste à découvrir si l'effet de groupe s'apparente plus à de la facilitation sociale du rappel de la mémoire ou à un suivi des autres mouches. Chez les colonies de fourmis *Leptothorax albipennis*, il a été démontré une composante collective de la performance du temps d'émigration vers un nouveau site, au moins en partie par facilitation du cheminement des jeunes non expérimentés et d'adultes passifs (Langridge *et al.* 2004).

On retrouve également cette notion d'apprentissage social sous le terme d'« intelligence collective », spécialement dans la société humaine pour laquelle on inclut le niveau symbolique de la culture. Ciment des organisations sociales (groupe, tribu, entreprise, équipe, gouvernements, nations, associations, guildes...), l'intelligence collective se définit alors par le rassemblement des individus pour échanger et collaborer. Avec du management et des outils adaptés, cela peut aboutir à une entité émergente manifestement plus « intelligente » que ses constituants individuels, avec un avantage individuel et collectif supérieur à ce qui aurait été obtenu si chacun était resté isolé⁵¹. Le terme de « mémoire collective » est également utilisé plus spécifiquement dans le cadre du rappel de la mémoire en collectivité chez l'homme, où le résultat global du rappel d'évènements est plus détaillé et/ou mieux organisé lorsque les personnes collaborent plutôt que de travailler de manière isolée durant l'effort du rappel (Weldon et Bellinger 1997; Yaron-Antar et Nachson 2006). Nos résultats sur la drosophile évoquent cette mémoire collective, non dans sa fonction sociale mais en termes de performances⁵². Quelques études commencent également à discuter le lien entre l'intelligence collective chez l'homme, conceptualisée à partir des sciences sociales, et les phénomènes de performances collectives découverts chez les animaux à partir des sciences biologiques (voir par exemple Wilson 2005; Couzin 2007).

⁵¹ Voir par exemple, pour l'application en entreprise, les livres de Pierre Levy (1994) « L'intelligence collective. Pour une anthropologie du cyberspace » Ed. La découverte, Paris, et de Olivier Zara (2008) « Management de l'intelligence collective, vers une nouvelle gouvernance » 2em ed, M21 Editions, Paris.

⁵² Voir dans l'introduction, la partie 4.2.5a « Notions de mémoire sociale ».

4.3 Utilisation de la drosophile pour l'étude de l'évolution de la socialité et pour l'étude génétique des comportements sociaux

La drosophile pourrait être un modèle intermédiaire entre les insectes solitaires et sociaux, avec le maintien en groupes sociaux en fonction des conditions environnementales, lorsque le fait d'être en groupe devient bénéfique. D'une manière générale, la drosophile pourrait donc être utilisée comme modèle d'étude des mécanismes d'émergence de la socialité, au niveau des causes proximales et ultimes.

La comparaison des espèces eusociales avec des espèces comme la drosophile, de niveau social inférieur ou du moins différent, permet déjà d'investiguer les bases génétiques et physiologiques des comportements eusociaux. Ces travaux suggèrent que l'évolution peut utiliser des mécanismes de régulations physiologiques pré-existants chez les ancêtres solitaires et leur donner une nouvelle fonction à la base de l'émergence des phénotypes sociaux (Amdam *et al.* 2004, 2007; Nelson *et al.* 2007). Ainsi, plusieurs chercheurs démontrent que les voies de la vitellogenine et de l'hormone juvénile (typiquement impliqués dans la reproduction chez la plupart des insectes) sont impliquées dans la régulation de comportements eusociaux chez l'abeille *Apis mellifera* (Amdam *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2007), et que ces voies existent et fonctionnent de manière similaire en essence chez la drosophile (Flatt *et al.* 2005; Amdam *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2007). Dans cette démarche par contre, il semble qu'ils considèrent la drosophile comme un insecte solitaire contrôlé et pensent observer des caractéristiques propres à la socialité. Il serait prudent de vérifier si les mécanismes décrits ne sont pas également impliqués chez la drosophile pour ses propres comportements sociaux.

Dans le cadre de l'étude des déterminants génétiques et épigénétiques des comportements sociaux, il serait intéressant de développer des paradigmes d'apprentissages sociaux chez la drosophile, en utilisant par exemple le dispositif proposé par Polejack et Tidon (2002).⁵³ La drosophile commence à être utilisée comme modèle d'étude génétique de pathologies des comportements sociaux chez l'homme, dans le but d'améliorer l'efficacité des traitements pour les patients souffrant de désordres comportementaux. Par exemple, Simon AF et Krantz DE (UCLA)⁵⁴ utiliseraient actuellement la drosophile pour étudier les bases génétiques et neuronales de l'autisme, mesuré chez la drosophile par les réponses comportementales à la présence des autres mouches. La drosophile est également utilisée pour l'étude des

⁵³ Ces auteurs ont récemment étudié chez *Drosophila mercatorum* (du groupe *repleta*, voir fig. 30) si le développement des comportements des mâles pour la parade sexuelle pouvait être influencé par de l'apprentissage par observation des congénères, mais sans succès (Polejack et Tidon 2007).

⁵⁴ Voir les sites web: http://www.narsad.org/research/granted_lists/bios/yi2007simon.html et: <http://www.autism.ucla.edu/events/simon.php>

déterminants génétiques et épigénétiques des comportements agressifs dans le but d'aider à comprendre les bases de ces comportements chez l'homme (Edwards *et al.* 2006).

Concernant les causes ultimes de l'émergence de la socialité, la drosophile pourrait également être utilisée au niveau de la population et de l'écosystème.

Au niveau de la population, il faudrait déjà vérifier si le niveau de vie sociale diffère entre les espèces de drosophile⁵⁵. La plupart des espèces du groupe *melanogaster* utilise des phéromones d'agrégation similaires de la cVA, ce qui suggère qu'elles ont évolué de manière graduelle sans forte sélection de spécificité d'espèces. Par contre, chez les espèces du groupe *virilis*, il n'y a pas de relation entre les différences de phéromone et la distance phylogénétique, ce qui suggère que les événements de spéciation se sont faits par des changements brutaux des compositions chimiques (Symonds and Wertheim 2005). La phéromone d'agrégation doit être une base importante de l'apparition de la vie sociale chez la drosophile et il serait intéressant d'étudier comment les comportements sociaux qui l'impliquent ont évolué entre les espèces des groupes *melanogaster* et *virilis*.

Au niveau de l'écosystème, l'étude des comportements sociaux peut également participer à la compréhension de l'équilibre entre les espèces. Il a par exemple été démontré l'importance de la phéromone d'agrégation pour la co-évolution avec les prédateurs, avec l'exemple des parasitoïdes de drosophiles qui utilisent aussi la phéromone pour détecter les nids de ponte (Wiskerke *et al.* 1993; Wertheim *et al.* 2006). Plusieurs études ont également montré un bénéfice du comportement d'agrégation sur la biodiversité des espèces vivant sur des ressources éphémères (Krijger et Sevenster 2001). La phéromone d'agrégation des différentes espèces de drosophile du groupe *Melanogaster* permet d'attirer également les hétérospécifiques (Jaenike *et al.* 1992; Wertheim 2001), mais du fait de la compétition entre conspécifiques et hétérospécifiques⁵⁶, il n'y a pas d'agrégation interspécifique pour la ponte (Takahashi 2006). L'agrégation intraspécifique permet de laisser libres d'autres patches alimentaires pour les autres espèces de drosophiles, limitant ainsi la compétition interspécifique au détriment de la compétition intraspécifique, elle-même pouvant être régulée via une organisation sociale du groupe⁵⁷. Il serait intéressant d'étudier si le rapprochement génétique entre les individus du groupe peut favoriser le développement des comportements sociaux mutualistes chez la drosophile, comme dans le cadre de la théorie de la sélection de parentèle de Hamilton (1964).

⁵⁵ Voir en Annexes, Fig. 30 « Arbre phylogénétique des drosophiles ».

⁵⁶ A noter: certaines situations permettent à des espèces de drosophiles de trouver un avantage à la cohabitation: le développement larvaire de *D. Hydei* est facilité par la présence de larves *D. melanogaster* face à un compétiteur commun comme les moisissures (Hodge *et al.* 1999).

⁵⁷ Voir le tableau 1 « Synthèse des comportements sociaux et des phénomènes de facilitation sociale et de coopération découverts jusqu'à présent chez *Drosophila melanogaster*. »

V. CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude de la mémoire olfactive chez la drosophile a très longtemps été basée sur le paradigme de conditionnement classique aversif. Une importante partie de ma thèse a consisté à la mise au point de nouveaux paradigmes pour l'étude des mémoires olfactives, dans des contextes appétitifs susceptibles d'être plus proches de situations naturelles et du répertoire comportemental de la drosophile.

Des résultats originaux ont été obtenus sur le conditionnement olfactif de l'activité du proboscis, et sur l'influence du groupe dans le rappel de la mémoire aversive.

Les résultats issus de mon travail de thèse offrent plusieurs perspectives pour étudier les mécanismes du conditionnement appétitif chez la drosophile et les comparer à ceux du conditionnement aversif, afin de déterminer les mécanismes généralisables ou dépendants du contexte motivationnel et environnemental.

L'étude de la phase de rappel de la mémoire constitue un centre d'intérêt croissant à l'heure actuelle, et nos résultats sur les caractéristiques de la réponse conditionnée individuelle sont une rampe de lancement pour la suite des investigations.

Enfin, mon travail de thèse a consisté à replacer la drosophile comme une espèce potentiellement sociale, tout d'abord par une synthèse tendant vers l'exhaustivité des travaux démontrant l'existence de caractéristiques propres aux groupes sociaux chez la drosophile, puis par la découverte d'un bénéfice du groupe sur certaines performances de mémoire aversive. Ainsi la drosophile pourrait se poser comme un modèle d'étude de l'évolution de la socialité.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ackerman SL & Siegel RW (1986) Chemically reinforced conditioned courtship in *Drosophila*: responses to wild-type and the dunce, amnesiac and don giovanni mutants. *J. Neurogenet.* **3**: 111-123.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD *et al.* (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**(5461): 2185-2195.
- Addessi E (2007) How do primates learn what to eat? A comparative approach. In: Le social dans tous ses états, 41^e colloque de la *Société Française pour l'Etude du Comportement Animal*, p 44.
- Alcock J (1993) Animal behavior. An evolutionary approach. 5th edition. Sinauer Associates, Sunderland, Mass, 625 p.
- Alexander RD (1961) Agressiveness, territoriality and sexual behavior in field crickets (Orthoptera: Gryllidae). *Behaviour* **17**: 130-223.
- Allemand R (1983) The circadian oviposition rhythm of *Drosophila melanogaster*. II Influence of biotic factors. *Biol. Behav.* **8**(4): 273-288.
- Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK, Page RE Jr (2004) Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 11350-11355.
- Amdam GV, Nilsen KA, Norberg K, Fondrk MK & Hartfelder K (2007) Variation in endocrine signalling underlies variation in social life history. *Am. Nat.* **170**(1): 37-46.
- Amrein H (2004) Pheromone perception and behavior in *Drosophila*. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**: 435-442.
- Anholt RR & Mackay TFC (2004) Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nature Rev. Genet.* **5**: 838-849.
- Antony C & Jallon JM (1982) The chemical basis for sex recognition in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect. Physiol.* **28**: 873-880.
- Avondet JL, Blair RB, Berg DJ & Ebbert MA (2003) *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) response to changes in ecological parameters across an urban gradient. *Environ. Entomol.* **32**(2): 347-358.

B

- Bartelt RJ, Schaner AM & Jackson LL (1985) Cis-vaccenyl acetate as an aggregation pheromone in *Drosophila melanogaster*. *J. Chem. Ecol.* **11**: 1747-1756.

- Baudoin C *et al.* (2003) Bien-être, élevages et expérimentation. In: L'éthologie appliquée aujourd'hui, volume 1, ED editions, 230 p.
- Beck CD & Rankin CH (1995) Heat shock disrupts long-term memory consolidation in *Caenorhabditis elegans*. *Learn. Mem.* **2**: 161-177.
- Benard J, Stach S & Giurfa M (2006) Categorization of visual stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *Anim. Cogn.* **9**(4): 257-270.
- Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski M & Robinson GE (2002) Influence of gene action across different time scales on behaviour. *Science* **296**: 741-744.
- Benton R (2007) Sensitivity and specificity in *Drosophila* pheromone perception. *Trends Neurosci.* **30**(10): 512-519.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A & Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* **97**: 107-119.
- Blodgett HC (1929) The effect of the introduction of reward upon the maze performance of rats. *Univ. Cal. Pub. Psychol.* **4**(8): 113-134.
- Boal J (1991) Complex learning in *Octopus bimaculoides*. *American Malacol. Bulletin* **9**(1): 75-80.
- Booker R & Quinn WG (1981) Conditioning of leg position in normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Neurobiol.* **78**(6): 3940-3944.
- Brembs B & Heisenberg M (2000) The operant and the classical in conditioned orientation of *Drosophila melanogaster* in the flight simulator. *Learn. Mem.* **7**: 104-115
- Brembs B & Heisenberg M (2001) Conditioning with compound stimuli in *Drosophila melanogaster* in the flight simulator. *J. Exp. Biol.* **204**: 2849-2859.
- Brembs B (2003) Operant conditioning in invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* **13**: 710-717.
- Brembs B & Plendl W (2008) Double dissociation of PKC and AC manipulations on operant and classical learning in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **18**(15): 1168-1171.
- Budick SA & Dickinson MH (2006) Free-flight responses of *Drosophila melanogaster* to attractive odors. *J. Exp. Biol.* **209**(15): 3001-3017.

C

- Cammarota M, Barros DM, Vianna MRM, Bevilaqua LRM, Coitinho A *et al.* (2004) The transition from memory retrieval to extinction. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **76**(3): 573-582.
- Cammarota M, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Ramirez M, Medina JH & Izquierdo I (2005) Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol. Learn. Mem.* **84**(1): 25-32.

- Campan R & Scapini F (2002) Ethologie, approche systématique du comportement. De Boeck Université, Bruxelles, 737 p.
- Capaldi EJ & Neath I (1995) Remembering and forgetting as context discrimination. *Learn. Mem.* **2**(2-3): 107-132.
- Carton Y, Boulétreau M, van Alphen JJM & van Lenteren JC (1986) The *Drosophila* parasitic wasps. In: Ashburner M, Carlson HL, Thompson JN Jr (eds) The genetics and biology of *Drosophila*. 3th Academic Press, London, pp 347-394.
- Certel SJ, Savella MG, Schlegel DC & Kravitz EA (2007) Modulation of *Drosophila* male behavioral choice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(11): 4706-4711.
- Chabaud MA (2003) Première mise en évidence d'un conditionnement olfactif de l'extension du proboscis chez *Drosophila melanogaster*. Master Biologie du Comportement, Université Paris 13, Villetaneuse, 26 p.
- Chabaud MA, Devaud JM, Pham-Delegue MH, Preat T & Kaiser L (2006) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **192**, 1335-1348.
- Chandra SB & Singh S (2005) Chemosensory processing in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*: generalization of a feeding response reveals overlapping odour representations. *J. Biosci.* **30**(5): 679-688.
- Charro MJ & Alcorta E (1994) Quantifying relative importance of maxillary palp information on the olfactory behaviour of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. [A]* **175**(6): 761-766.
- Chapman RF (1998) The insects: structure and function. 4th Ed, Cambridge University Press. 770 p.
- Chase ID, Bartolomeo C & Dugatkin LA (1994) Aggressive interactions and inter-contest interval: how long do winners keep winning? *Anim. Behav.* **48**: 393-400.
- Chen CN, Denome S & Davis RL (1986) Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce*⁺ gene, the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 9313-9317.
- Chen S, Lee AY, Bowens NM, Huber R & Kravitz EA (2002) Fighting fruit flies: a model system for the study of aggression. *PNAS* **99**: 5664-5668.
- Chittka L & Leadbeater E (2005) Social learning: public information in insects. *Curr. Biol.* **15**(21): r869-r871.
- Comas D, Petit F & Preat T (2004) *Drosophila* long-term memory formation involves regulation of cathepsin activity. *Nature* **430**: 460-463.
- Connolly KJ (1968) The social facilitation of preening behaviour in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* **16**(2): 385-391.

- Coolen I, Dangles O & Casas J (2005) Social learning in non-colonial insects? *Curr. Biol.* **15**: 1931-1935.
- Costa JT (2006) The other insect societies. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, 812 p.
- Courtney SP, Kibota TT & Singleton TA (1990) Ecology of mushroom-feeding *Drosophilidae*. *Adv. Ecol. Res.* **20**: 225-274.
- Couty A, Kaiser L, Huet D & Pham-Delegue MH (1999) The attractiveness of different odour sources from the fruit-host complex in *Leptopilina boulardi*, a larval parasitoid of frugivorous *Drosophila* spp. *Physiol. Entomol.* **24**: 76-82.
- Couzin ID, Krause J, James R, Ruxtons GD & Franks NR (2002) Collective memory and spatial sorting in animal groups. *J. theor. Biol.* **218**: 1-11.
- Couzin I (2007) Collective minds. *Nature* **445**(15): 715.
- Crittenden JR, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D & Davis RL (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn. Mem.* **5**: 38-51.

D

- Dahanukar A, Foster K, van der Goes van Naters WM & Carlson J R (2001) A Gr receptor is required for response to the sugar trehalose in taste neurons of *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* **4**: 1182-1186.
- Davis RL (2001) Mushroom bodies, Ca²⁺ oscillations, and the memory gene amnesiac. *Neuron* **30**: 653-656.
- Davis RL (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu. Rev. Neurosci.* **28**: 275-302.
- de Belle SJ & Heisenberg M (1994) Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* **263**(5147): 692-695.
- de Bono M & Bargmann CI (1998) Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. *Cell* **94**(5): 679-689.
- de Bruyne M, Clyne PJ & Carlson JR (1999) Odor coding in a model olfactory organ: the *Drosophila* maxillary palp. *J. Neurosci.* **19**(11): 4520-4532.
- de Hoz L, Martin SJ & Morris RGM (2004) Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol.* **2**(8): e225.
- DeJanne D, McGuire TR & Pruzan-Hotchkiss A (1985) Conditioned suppression of proboscis extension in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Psychol.* **99**(1): 74-80.
- De Jong R & Kaiser L (1991) Odor learning by *Leptopilina boulardi*, a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae). *J. Insect Behav.* **4**: 743-750.

- Del Solar Osses E (1998) Aggregation tendency in small groups of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Biol.* **21**: 25-30.
- Dennet D (1998) La diversité des esprits: une approche de la conscience. Ed. Hachette Sciences, 240 p.
- Dethier VG, Solomon RL & Turner LH (1965) Sensory input and central excitation and inhibition in the blowfly. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **60**(3): 303-313.
- Dethier VG (1966) Insects and the concept of motivation. In: Nebraska Symposium on Motivation (Ed. By D. Levine), Vol. XIV. Lincoln: University of Nebraska Press.
- Devaud JM (2003) Experimental studies of adult *Drosophila* chemosensory behaviour. *Behav. Processes* **64**(2): 177-196.
- Devaud JM, Acebes A, Ramaswami M & Ferrùs A (2003) Structural and functional changes in the olfactory pathways of adult *Drosophila* take place at a critical age. *J. Neurobiol.* **56**(1): 13-23.
- DeZazzo J, Xia S, Christensen J, Velinzon K & Tully T (1999) *J. Neurosci.* **19**: 8740-8746.
- Didelot G (2006) La mémoire à long terme chez la drosophile: un cadre d'étude des retards mentaux non syndromiques. Thèse, Université Paris XI. 228 p.
- Djawdan M, Chippindale AK, Rose MR & Bradley TJ (1998) Metabolic reserves and evolved stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* **71**(5): 584-594.
- Domjan M (2005) Pavlovian conditioning: a functional perspective. *Annu. Rev. Psychol.* **56**: 179-206.
- Dow MA & von Schilcher F (1975) Aggression and mating success in *Drosophila melanogaster*. *Nature* **254**: 511-512.
- Drain P, Folkers E & Quinn WG (1991) cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* **6**: 71-82.
- Dubnau J, Grady L, Kitamoto T & Tully T (2001) Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* **411**(6836): 476-480.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG & Benzer S (1976) dunce, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**(5): 1684-1688.
- Dudai Y, Corfas G & Hazvi S (1988) What is the possible contribution of Ca²⁺-stimulated adenylate cyclase to acquisition, consolidation and retention of an associative olfactory memory in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. [A]* **162**(1): 101-109.
- Dudai Y (1989a) The conceptual and experimental framework. In: The neurobiology of memory: concepts, findings, trends. Oxford Univ. Press, New-York, pp 3-17.
- Dudai Y (1989b) Paradigms and research tools. In: The neurobiology of memory: concepts, findings, trends. Oxford Univ. Press, New-York, pp 23-30.

E

- Eberl DF, Duyk GM & Perrimon N (1997) A genetic screen for mutations that disrupt an auditory response in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 14837-14842.
- Eberl DF (1999) Feeling the vibes: chordotonal mechanisms in insect hearing. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**: 389–393.
- Edgecomb RS, Harth CE & Schneiderman AM (1994) Regulation of feeding in adult *Drosophila melanogaster* varies with feeding regime and nutritional state. *J. Exp. Biol.* **197**: 215-235.
- Edwards AC, Rollmann SM, Morgan TJ & Mackay TFC (2006) Quantitative genomics of aggressive behavior in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Genet.* **2**(9): 1386-1395.
- Ejima A, Smith BPC, Lucas C, Levine JD & Griffith LC (2005) Sequential learning of pheromonal cues modulates memory consolidation in trainer-specific associative courtship conditioning. *Curr. Biol.* **15**: 194-206.
- Ejima A, Smith BPC, Lucas C, van der Goes van Naters W, Miller CJ, Carlson JR, Levine JD & Griffith LC (2007) Generalization of courtship learning in *Drosophila* is mediated by cis-vaccenyl acetate. *Curr. Biol.* **17**: 599-605.
- Ellenbogen JM, Hu PT, Payne JD, Titone D, & Walker MP (2007) Human relational memory requires time and sleep. *PNAS* **104**(18): 7723-7728.
- Emeson RB & Morabito MV (2005) Food fight: the NPY-serotonin link between aggression and feeding behavior. *Sci. STKE* **2005**(277): pe12.
- Emptage NJ & Carew TJ (1993) Long-term synaptic facilitation in the absence of short-term facilitation in *Aplysia* neurons. *Science* **262**(5131): 253-256.

F

- Faber T, Joerges J & Menzel R (1999) Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat. Neurosci.* **2**(1): 74-78.
- Fan RJ, Anderson P & Hansson BS (1997) Behavioural analysis of olfactory conditioning in the moth *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Exp. Biol.* **200**: 2969-2976.
- Feany MB & Quinn WG (1995) A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Science* **268**: 869-873.
- Ferreira G (2004) Apprentissages alimentaires: mécanismes neurobiologiques impliqués dans le développement de l'aversion gustative chez le rat. *Science des Aliments* **24**: 53-69.

- Fiorito G & Scotto P (1992) Observational learning in *Octopus vulgaris*. *Science* **256**(5056): 545-547.
- Flatt T, Tu MP & Tatar M (2005) Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *Bioessays* **27**: 999-1010.
- Folkers E, Drain P & Quinn WG (1993) radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8123-8127.
- Folkers E, Waddell S & Quinn WG (2006) The *Drosophila* radish gene encodes a protein required for anesthesia-resistant memory. *PNAS* **103**(46): 17496-17500.
- Fresquet N & Medioni J (1993) Effect of ageing on visual discrimination learning in *Drosophila melanogaster*. *Q. J. Exp. Psychol. [B], Comp. Physiol. Psychol.* **46**(4): 399-412.
- Fresquet N (1999) Effects of aging on the acquisition and extinction of excitatory conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Behav.* **67**(2): 205-211.
- Friedrich A, Thomas U & Müller U (2004) Learning at different satiation levels reveals parallel functions for the cAMP-protein kinase A cascade in formation of long-term memory. *J. Neurosci.* **24**(18): 4460-4468.
- Frings H (1941) The loci of olfactory end-organs in the blowfly, *Cynomyia cadaverina* Desvoidy. *J. Exp. Zool.* **88**: 65-93.
- Frye MA, Tarsitano M & Dickinson MH (2003) Odor localization requires visual feedback during free flight in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **206**: 843-855.
- Frye MA & Dickinson MH (2004) Motor output reflects the linear superposition of visual and olfactory inputs in *Drosophila*. *J. Exp. Biol.* **207**(Pt 1): 123-131.
- Fuller JL & Hahn ME (1976) Issues in the genetics of social behaviour. *Behav. Genet.* **6**(4): 391-406.

G

- Ganguly-Fitzgerald, Donlea J & Shaw PJ (2006) Waking experience affects sleep need in *Drosophila*. *Science* **313**(5794):1775-1781.
- Garelick MG & Storm DR (2005) The relationship between memory retrieval and memory extinction. *PNAS* **102**(26): 9091-9092.
- Giurfa M & Malun D (2004) Associative mechanosensory conditioning of the proboscis extension reflex in honeybees. *Learn. Mem.* **11**(3): 294-302.
- Gerber B & Stocker RF (2006) The *Drosophila* larva as a model for studying chemosensation and chemosensory learning: a review. *Chem. Senses* **32**: 65-89.
- Godfray HCJ, Partridge L & Harvey PH (1991) Clutch size. *A. Rev. Ecol. Syst.* **22**: 409-429.
- Göpfert MC & Robert D (2002) The mechanical basis of *Drosophila* audition. *J. Exp. Biol.* **205**: 1199-1208.

- Greenspan RJ & van Swinderen B (2004) Cognitive consonance: complex brain functions in the fruitfly and its relatives. *Trends Neurosci.* **27**(12): 707-711.
- Gregg TG, McGrate A, Reveal G, Hall S & Rypstra AL (1990) Insectivory and social digestion in *Drosophila*. *Biochem. Genet.* **28**(3/4): 197-207.
- Grillet M, Dartevelle L & Ferveur JF (2006) A *Drosophila* male pheromone affects female sexual receptivity. *Proc. R. Soc. B* **273**: 315-323.
- Guo J & Guo A (2005) Crossmodal interactions between olfactory and visual learning in *Drosophila*. *Science* **309**: 307-340.

H

- Ha TS & Smith DP (2006) A pheromone receptor mediates 11-cis-vaccenyl acetate induced responses in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **26**(34): 8727-8733.
- Hallem EA, Ho MG & Carlson JR (2004) The molecular basis of odor coding in the *Drosophila* antenna. *Cell* **117**: 965-979.
- Hamilton WD (1964) The genetical evolution of social behaviour I, II. *J. Theoretic. Biol.* **7**: 1-16, 17-52.
- Hammer M (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* **366**: 59-63.
- Hammer M, Braun G & Maelshagen J (1994) Food-induced arousal and nonassociative learning in Honeybees: dependence of sensitization on the application site and duration of food stimulation. *Behav. Neur. Biol.* **62**: 210-223.
- Hammer M & Menzel R (1998) Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn. Mem.* **5**: 146-156.
- Han PL, Levin LR, Reed RR & Davis RL (1992) Preferential expression of the *Drosophila* rutabaga gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* **9**: 619-627.
- Haney J & Lukowiak K (2001) Context learning and the effect of context on memory retrieval in *Lymnae*. *Learn. Mem.* **8**: 35-43.
- Harlow HF (1949) The formation of learning sets. *Psychol. Rev.* **15**: 51-65.
- Hartlieb E (1996) Olfactory conditioning in the moth *Heliothis virescens*. *Naturwissenschaften* **83**: 87-88
- Hartlieb E, Anderson P & Hansson BS (1999) Appetitive learning odours with different behavioural meaning in moths. *Physiol. Behav.* **67**(5): 671-677.
- Hay DA (1972) Recognition by *Drosophila melanogaster* of individuals from other strains or cultures: support for the role of olfactory cues in selective mating? *Evolution* **26**: 171-176.

- Hay DA (1973) Effects of genetic variation and culture conditions on the social behaviour of *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* **3**(2): 107-119.
- Heard SB & Remer LC (1997) Clutch-size behavior and coexistence in ephemeral-patch competition models. *Am. Nat.* **150**: 744–770.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S & Byers D (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. Neurogenet.* **2**: 1-30.
- Heisenberg M, Heusipp M & Wanke C (1995) Structural plasticity in the *Drosophila* brain. *J. Neurosci.* **15**(3): 1951-1960.
- Hendricks JC, Finn SM, Panckeri KA, Chavkin J, Williams JA *et al.* (2000) Rest in *Drosophila* is a sleep-like state. *Neuron* **25**: 129-138.
- Hinde RA & Stevenson-Hinde J (Eds.) (1973) Constraints of learning: limitations and predispositions. Academic Press Inc, New-York, 488 p.
- Hiroi M, Marion-Poll F & Tanimura T (2002) Differentiated response to sugars among labellar chemosensilla in *Drosophila*. *Zool. Sci.* **19**:1009-1018.
- Hirsch HVB & Tompkins L (1994) The flexible fly: experience-dependent development of complex behaviors in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **195**: 1-18.
- Higgins LA, Jones KM & Wayne ML (2005) Quantitative genetics of natural variation of behaviour in *Drosophila melanogaster*: the possible role of the social environment on creating persistent patterns of group activity. *Evolution* **59**(7): 1529-1539.
- Hodge S & Arthur W (1997) Direct and indirect effects of *Drosophila* larvae on the growth of moulds. *The Entomologist* **116**: 198-204.
- Hodge S, Mitchell P & Arthur W (1999) Factors affecting the occurrence of facilitative effects in interspecific interactions: an experiment using two species of *Drosophila* and *Aspergillus niger*. *Oikos* **87**(1): 166-174.
- Hoffmann AA (1987) A laboratory study of male territoriality in the sibling species *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Anim. Behav.* **35**: 807-818.
- Hoffmann A (1990) The influence of age and experience with conspecifics on territorial behaviour in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Behav.* **3**: 1-12.
- Hoffmann AA & Cacoyianni Z (1990) Territoriality in *Drosophila melanogaster* as a conditional strategy. *Anim. Behav.* **40**(3): 526-537.
- Hoffmeister TS & Rohlf M (2001) Aggregative egg distributions may promote species coexistence: but why do they exist? *Evol. Ecol. Res.* **3**: 37-50.
- Holliday M & Hirsch J (1986) Excitatory conditioning of individual *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Processes* **12**(2): 131-142.

- Honjo K & Furukubo-Tokunaga K (2005) Induction of cAMP response element-binding protein-dependent medium-term memory by appetitive gustatory reinforcement in *Drosophila* larvae. *J. Neurosci.* **25**(35): 7905-7913.
- Howard RW & Blomquist GJ (2005) Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu. Rev. Entomol.* **50**: 371-393.
- Hsu Y & Wolf LL (1999) The winner and loser effect: integrating multiple experiences. *Anim. Behav.* **57**: 903-910.
- Hunter AF (2000) Gregariousness and repellent defences in the survival of phytophagous insects. *Oikos* **91**: 213-224.

I

- Inamdar M, VijayRaghavan K, Rodrigues V (1993) The *Drosophila* homolog of the human transcription factor TEF-1, scalloped, is essential for normal taste behavior. *J. Neurogenet.* **9**: 123-139.
- Isabel G, Pascual A & Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* **304**: 1024-1027.
- Isabel G, Martin JR, Chidami S, Veenstra JA & Rosay P (2005) AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *AM. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **288**(2): R531-538.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D & Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn. Mem.* **5**: 52-77.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MR, Coitinho A, de David e Silva T *et al.* (2002) Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* **22**: 269-287.

J

- Jaenicke J & James AC (1991) Aggregation and the coexistence of mycophagous *Drosophila*. *J. Anim. Ecol.* **60**: 913-928.
- Jaenicke J, Bartelt RJ, Huberty AF, Thibault S & Libler JS (1992) Aggregations in mycophagous *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): candidate pheromones and fields responses. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **85**: 696-704.
- Jaisson P (1985) Social behaviour. In GA Kerbut et LI Gilbert (Eds) *Comprehensive insect physiology. Biochemistry and Pharmacology* vol 9 Oxford, Pergamon Press.
- Joiner WJ, Crocker A, White BH & Sehgal A (2006) Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature* **441**(7094): 757-760.

- Jones WD, Cayirlioglu P, Grunwald Kadow I & Vosshall LB (2007) Two chemosensory receptors together mediate carbon dioxide detection in *Drosophila*. *Nature* **445**: 86-90.
- Jozet-Alves C, Modéran J & Dickel L (2008) Sex differences in spatial cognition in an invertebrate: the cuttlefish. *Proc. R. Soc. B* **275**(1646): 2049-2054.
- Judice CC, Carazzole MF, Festa F, Sogoyar MC, Hartfelder K & Pereira GA (2006) Gene expression profiles underlying alternative caste phenotypes in a highly eusocial bee, *Melipona quadrifasciata*. *Insect Mol. Biol.* **15**(1): 33-44.

K

- Kaiser L & De Jong R (1995) Induction of odour preference in a specialist insect parasitoid. *Anim. Learn. Behav.* **23**: 17-21.
- Kamyshev NG, Smirnova GP, Kamysheva EA, Nikiforov ON, Parafenyuk IV & Ponomarenko VV (2002) Plasticity of social behavior in *Drosophila*. *Neurosci. Behav. Physiol.* **32**(4): 401-408.
- Kandel ER (1976) Cellular basis of behavior: an introduction to behavioral neurobiology. San Francisco, Freeman.
- Kandel ER (2003) La biologie moléculaire de la mémoire: un dialogue entre gènes et synapses. *Med. Sci.* **19**(5): 625-633.
- Kavaliers M (1980) Social groupings and circadian activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Bull.* **158**: 69-76.
- Keene AC, Stratmann M, Keller A, Perrat PN, Vosshall LB & Waddell S (2004) Diverse odor-conditioned memories require uniquely timed dorsal paired medial neuron output. *Neuron* **44**: 521-533.
- Keene AC, Krashes MJ, Leung B, Bernard JA & Waddell S (2006) *Drosophila* dorsal paired medial neurons provide a general mechanism for memory consolidation. *Curr. Biol.* **16**: 1524-1530.
- Keller A (2007) *Drosophila melanogaster*'s history as a human commensal. *Curr. Biol.* **17**: R77-R81.
- Kim YC, Lee HG & Han KA (2007a) Classical reward conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Genes, Brain and Behav.* **6**(2): 201-207.
- Kim YC, Lee HG & Han KA (2007b) D1 dopamine receptor dDA1 is required in the mushroom body neurons for aversive and appetitive learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **27**(29): 7640-7647.
- Kim YK & Ehrman L (1998) Developmental isolation and subsequent adult behaviour of *Drosophila paulistorum*. IV Courtship. *Behav. Genet.* **28**(1): 57-65.

- Krafft K (1971) Contribution à la biologie et à l'éthologie de *Agelena consociate* Denis (araignée sociale du Gabon). III. Etude expérimentale de certains phénomènes sociaux. *Biol. Gabon*. **7**: 1.
- Krashes MJ, Keene AC, Leung B, Armstrong JD & Waddell S (2007) Sequential use of mushroom body neuron subsets during *Drosophila* odor memory processing. *Neuron* **53**: 103-115.
- Krashes MJ & Waddell S (2008) Rapid consolidation to a radish and protein synthesis-dependent long-term memory after single-session appetitive olfactory conditioning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **28**(12): 3103-3113.
- Krause J & Ruxton GD (2002) Living in groups. Oxford: Oxford University Press.
- Krebs JR & Davis NB (1996) Introduction to behavioural ecology. Blackwell, Oxford.
- Krijger CL & Sevenster JG (2001) Higher species diversity explained by stronger spatial aggregation across six neotropical *Drosophila* communities. *Ecol. Lett.* **4**(2): 106-115.
- Kurtovic A, Widmer A & Dickson BJ (2007) A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature* **446**: 542-546.

L

- Laloi D (1999) Reconnaissance d'odeurs complexes par l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et le bourdon (*Bombus terrestris* L.): facteurs épigénétiques et génétiques de la plasticité comportementale. Diploma Thesis, Paris XI University, Orsay, France, 231 p.
- Laloi D, Sandoz JC, Picard-Nizou AL, Marchesi A, Pouvreau A *et al.* (1998) Olfactory conditioning of the proboscis extension in bumble bees. *Entomol. Exp. Appl.* **90**: 123-129.
- Lambin M, Déglise P & Gauthier M (2005) Antennal movements as indicators of odor detection by worker honeybees. *Apidologie* **36**: 119-126.
- Langridge EA, Franks NR & Sendova-Franks AB (2004) Improvement in collective performance with experience in ants. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **56**: 523-529.
- Le Bourg E (2004) Effects of aging on learned suppression of photopositive tendencies in *Drosophila melanogaster*. *Neurobiol. Aging* **25**(9): 1241-1252.
- Le Bourg E (2005) Humidity as an aversive stimulus in learning in *Drosophila melanogaster*. *Learn. Behav.* **33**(3): 265-276.
- Lefranc A, Jeune B, Thomas-Orillard M & Danchin E (2001) Non-independence of individuals in a population of *Drosophila melanogaster*: effects of spatial distribution and dispersal. *C. R. Acad. Sci. III* **324**(3): 219-227.
- Lent DD & Kwon HW (2004) Antennal movements reveal associative learning in the American cockroach *Periplaneta Americana*. *J. Exp. Biol.* **207**: 369-375.

- Levin LR, Han PL, Hwang PM, Feinstein PG, Davis RL & Reed RR (1992) The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca²⁺/Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* **68**: 479-489.
- Levine JD, Funes P, Dowse HB & Hall JC (2002) Resetting the circadian clock by social experience in *Drosophila melanogaster*. *Science* **298**: 2010-2012.
- Lewis WJ & Takasu K (1990) Use of learned odours by a parasitic wasp in accordance with host and food needs. *Nature* **348**: 635-636.
- Liu G, Seiler H, Wen A, Zars T, Ito K, Wolf R, Heisenberg M & Liu L (2006) Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* **439**(2): 551-556.
- Liu L, Wolf R, Ernst R & Heisenberg M (1999) Context generalization in *Drosophila* visual learning requires the mushroom bodies. *Nature* **400**: 753-756.
- Liu W, Guo F, Lu B & Guo A (2008) Amnesiac regulates sleep onset and maintenance in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**(4):798-803.
- Livingstone MS, Sziber PP & Quinn WG (1984) Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylyl cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* **37**: 205-215.
- Lofdahl KL, Holliday M & Hirsch J (1992) Selection for conditionability in *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Psychol.* **106**(2): 172-183.
- Lu Y, Lu YS, Shuai Y, Feng C, Tully T *et al.* (2007) The AKAP Yu is required for olfactory long-term memory formation in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**(34): 13792-13797.

M

- Mao Z, Roman G, Zong L & Davis RL (2004). Pharmacogenetic rescue in time and space of the *rutabaga* memory impairment by using Gene-Switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 198-203.
- Maquet P, Laureys S, Peigneux P, Fuchs S, Petiau C *et al.* (2000) Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nat. Neurosci.* **3**(8): 831-836.
- Marella S, Fischler W, Kong P, Asgarian S, Rueckert E & Scott K (2006) Imaging taste responses in the fly brain reveals a functional map of taste category and behaviour. *Neuron* **49**: 285-295.
- Marimuthu G, Subbaraj R & Chandrashekar MK (1978) Social synchronization of the activity rhythm in a cave-dwelling insectivorous bat. *Naturwissenschaften* **65**: 600.
- Marimuthu G, Rajan S & Chandrashekar MK (1981) Social entrainment of the circadian rhythm in the flight activity of the microchiropteran bat *Hipposideros speoris*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **8**: 147-150.
- Martin JR, Rogers KL, Chagneau C & Brûlet P (2007) In vivo bioluminescence imaging of Ca signalling in the brain of *Drosophila*. *PLoS ONE* **2**: e275.

- Mauelshagen J, Sherff C & Carew TJ (1998) Differential induction of long-term synaptic facilitation by spaced and massed application of serotonin at the sensory neuron synapses of *Aplysia californica*. *Learn. Mem.* **5**: 246-256.
- Maynard Smith J (1956) Fertility, mating behavior and sexual selection in *Drosophila subobscura*. *J. Genet.* **54**: 261-279.
- McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D *et al.* (1999) Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* **24**(4): 967-977.
- McGuire SE (1986) Further evidence for learning in Diptera: a reply to Holliday and Hirsch. *Behav. Genet.* **16**(4): 457-473.
- McGuire SE, Le PT & Davis RL (2001) The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* **293**:1330-1333.
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K & Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**:1765-1768.
- McGuire SE, Deshazer M & Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog. Neurobiol.* **76**(5):328-347. (2006) Erratum in: *Prog. Neurobiol.* **79**(5-6):341-342.
- Medioni J, Cadieu N & Vaysse G (1978) Divergent selection for the rapid acquisition of conditioning in *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*). *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* **172**(5): 961-967.
- Melcher C & Pankratz MJ (2005) Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol.* **3**(9): e305.
- Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B & Fiala A (1999) Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav. Neurosci.* **113**(4): 744-754.
- Menzel R (2001) Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learn. Mem.* **8**(2): 53-62.
- Menzel R, Manz G, Menzel R & Greggers U (2001) Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn. Mem.* **8**(4): 198-208.
- Mery F & Kawecki TJ (2002) Experimental evolution of learning ability in fruit flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(22): 14274-14279.
- Mery F & Kawecki TJ (2004) The effect of learning on experimental evolution of resource preference in *Drosophila melanogaster*. *Evolution Int. J. Org. Evolution* **58**(4): 757-767.
- Mery F & Kawecki TJ (2005) A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* **308**: 1148.

- Mery F (2007) Aging and its differential effects on consolidated memory forms in *Drosophila*. *Exp. Gerontol.* **42**(1-2): 99-101.
- Mery F, Pont J, Preat T & Kawecki TJ (2007) Experimental evolution of olfactory memory in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Biochem. Zool.* **80**(4): 399-405.
- Meunier N, Ferveur JF & Marion-Poll F (2000) Sex-specific non-pheromonal taste receptors in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **10**(24): 1583-1586.
- Milliser JM & Uetz GW (2007) The most commonly studied social insects are the Hymenoptera, but what about the rest?. *Nature* **445**: 261-262.
- Milosevic NJ (1999) Dunce and amnesiac gene effect on signal learning in fruit flies *Drosophila melanogaster*: experiments with odors. *Russ. J. Genet.* **35**(2): 157-163.
- Miyamoto H, Katagiri H & Hensch T (2003) Experience-dependent slow-wave sleep development. *Nat. Neurosci.* **6**(6): 553-554.
- Morange M (2005) Les secrets du vivant: contre la pensée unique en biologie. Eds La Découverte, Paris, 221 p.
- Morita H & Shiraishi A (1985) Chemoreception Physiology. In: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, Kerkut GA & Gilbert LI (Eds), Pergamon Press, pp 133-170.
- Motosaka S, Koganezawa M, Narikawa S, Furuyama A, Shinozaki K, Isono K & Shimada I (2007) Cyclic AMP-dependent memory mutants are defective in the food choice behavior of *Drosophila*. *J. Comp. Physiol. [A]* **193**: 279-283.
- Mrosovsky N (1988) Phase response curves for social entrainment. *J. Comp. Physiol. [A]* **162**: 35-46.

N

- Nelson MC (1971) Classical conditioning in the blowfly (*Phormia regina*): associative and excitatory factors. *J. Comp. Psychol.* **77**(3): 353-368.
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE Jr & Amdam GV (2007) The gene *vitellogenin* has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biol.* **5**(3): 673-677.
- Nighorn A, Healy MJ & Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila* dunce gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* **6**: 455-467.
- Nilsen SP, Chan YB, Huber R & Kravitz EA (2004) Gender-selective patterns of aggressive behaviour in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **101**: 12342-12347.

P

- Parrish JK & Edelman-Keshet L (1999) Complexity, pattern, and evolutionary trade-offs in animal aggregation. *Science* **284**: 99-101.

- Pascual A & Preat T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* **294**: 1115-1117.
- Pedreira M E, Romano A, Tomsic D, Lozada M & Maldonado H (1998) Massed and spaced training build up different components of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Anim. Learn. Behav.* **26**: 34-45.
- Peitsch D, Fietz A, Hertel H, de Souza J, Ventura DF & Menzel R (1992) The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *J. Comp. Physiol. [A]* **170**(1): 23-40.
- Perazzona B, Isabel G, Preat T & Davis RL (2004) The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *J. Neurosci.* **24**: 8823-8828.
- Petterson J (1970) An aphid sex attractant. I. Biological studies. *Entomol. Scandinavia* **1**: 63-73.
- Phelan LL, Rodd ZA, Byers D & Rosellini RA (1998) Odour passive avoidance learning in individual *Drosophila melanogaster*: parametric investigations of unconditioned stimulus intensity and inter-trial-interval. *Learn. Motiv.* **29**: 83-101.
- Phelan LL, Rodd ZA, Hirsch HVB & Rosellini RA (2001) Exposure to cold: aversive pavlovian conditioning in individual *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Entomol.* **26**(3): 219-224.
- Pitman JL, McGill JJ, Keegan KP & Allada R (2006) A dynamic role for the mushroom bodies in promoting sleep in *Drosophila*. *Nature* **441**(7094):735-736.
- Platt SA, Holliday M & Drudge OW (1980) Discrimination learning of an instrumental response in individual *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Psychol.: Anim. Behav. Proc.* **6**(4): 301-311.
- Poeck B, Triphan T, Neuser K & Strauss R (2008) Locomotor control by the central complex in *Drosophila*-An analysis of the tay bridge mutant. *Dev. Neurobiol.* **68**(8): 1046-1058.
- Praag H, Kempermann G & Gage FH (2000) Neural consequences of environmental enrichment. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**(3): 191-198.
- Preat T (1998) Decreased odor avoidance after electric shock in *Drosophila* mutants biases learning and memory tests. *J. Neurosci.* **18**(20): 8534-8538.
- Preat T (1999) Testing associative learning in *Drosophila*. In: Crusio WE and Gerlai RT (eds.) Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behaviour research (Techniques in the behavioural and neuronal sciences). Elsevier Science BV 13: pp 79-126.
- Preat T (2004) Diverse mechanisms to remember various odors. *Neuron* **44**: 404-405.
- Predel R & Neupert S (2007) Social behavior and the evolution of neuropeptide genes: lessons from the honeybee genome. *Bioessays* **29**(5): 416-421.

Prokopy RJ & Roitberg BD (2001) Joining and avoidance behavior in nonsocial insects. *Annu. Rev. Entomol.* **46**: 631-665.

Q

Quinn WG, Harris WA & Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**(3): 708-712.

Quinn WG, Sziber PP & Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Nature* **277**: 212-214.

R

Ratcliffe JM & Ter Hofstede HM (2005) Roosts as information centres: social learning of food preferences in bats. *Biol. Lett.* **1**(1): 72-74.

Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M & Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **11**: 1114-1125.

Ribeiro S, Goyal V, Mello CV & Pavlides C (1999) Brain gene expression during SEM sleep depends on prior waking experience. *Learn. Mem.* **6**: 500-508.

Riemensperger T, Völler T, Stock P, Buchner E & Fiala A (2005) Punishment prediction by dopaminergic neurons in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **15**: 1953-1960.

Robinson GE & Ben Shahr Y (2002) Social behaviour and comparative genomics: new genes or new gene regulation? *Genes, Brain and Behav.* **1**: 197-203.

Rodan AR, Kiger JA Jr & Heberlein U (2002) Functional dissection of neuroanatomical loci regulating ethanol sensitivity in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **22**: 11035-11044.

Rodrigues V & Siddiqi O (1981) A gustatory mutant of *Drosophila* defective in pyranose receptors. *Molec. Gen. Genet.* **181**(3): 406-408.

Rohlf M & Hoffmeister TS (2003) An evolutionary explanation of the aggregation model of species coexistence. *Proc. R. Soc. Lond. B* **270**: S33-35.

Rohlf M & Hoffmeister TS (2004) Spatial aggregation across ephemeral resource patches in insect communities: an adaptive response to natural enemies? *Oecologia* **140**: 654-661.

Rohlf M (2005) Clash of kingdoms or why *Drosophila* larvae positively respond to fungal competitors. *Frontiers in Zoology* [online] **2**: 2.

Rohlf M, Obmann B & Petersen R (2005) Competition with filamentous fungi and its implication for a gregarious lifestyle in insects living on ephemeral resources. *Ecol. Entomol.* **30**(5): 556-563.

Rohlf M (2008) Host-parasitoid interaction as affected by interkingdom competition. *Oecologia* **155**(1): 161-168.

- Rosenzweig MR & Bennet EL (1977) Effects of environmental enrichment or impoverishment on learning and on brain values in rodents. In: Genetics, environment and intelligence, Ed. Oliviero, pp 163-196.
- Roussel E, Sandoz JC & Giurfa M (2007) Simultaneous behavioral and calcium imaging recordings during aversive conditioning in the honeybee. In: Le social dans tous ses états, 41^e colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal. p 75.
- Roux E, Sreng L, Provost E, Roux M & Clement JL (2002) Cuticular hydrocarbon profiles of dominant versus subordinate male *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *J. Chem. Ecol.* **28**(6): 1221-1235.
- Ruan H & Wu CF (2008) Social interaction-mediated lifespan extension of *Drosophila* Cu/Zn superoxide dismutase mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**(21): 7506-7510.
- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR *et al.* (2000) Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**: 2204-2215.
- Ruiz-Dubreuil G, Burnet B & Connolly K (1994) Behavioural correlates of selection for oviposition by *Drosophila melanogaster* females in a patchy environment. *Heredity* **73**: 103-110.
- Rybak F, Sureau G & Aubin T (2002) Functional coupling of acoustic and chemical signals in the courtship behaviour of the male *Drosophila melanogaster*. *Proc. Biol. Sci.* **269**(1492): 695-701.

S

- Salcedo E, Huber A, Henrich S, Chadwell LV, Chou WH *et al.* (1999) Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J. Neurosci.* **19**: 10716-10726.
- Sandoz JC, Hammer M & Menzel R (2002) Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learn. Mem.* **9**(5): 337-348.
- Sandoz JC, Roger B & Pham-Delègue MH (1995) Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical procedures of the proboscis extension response. *C.R. Acad. Sci. Ser. III* **318**: 749-755.
- Scheiner R, Erber J & Page RE (1999) Tactile learning and the individual evaluation of the reward in honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Comp. Physiol. [A]* **185**: 1-10.
- Scheiner R, Barnert M & Erber J (2003) Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honey bees. *Apidol.* **34**: 67-72.
- Scheiner R, Page RE & Erber J (2004) Sucrose responsiveness and behavioural plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidol.* **35**: 133-142.

- Schwaerzel M, Heisenberg M & Zars T (2002) Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* **35**: 951-960.
- 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*. *J. Neurosci.* **23**(33): 10495-10502.
- Schwärzel M & Müller U (2006) Dynamic memory networks: dissecting molecular mechanisms underlying associative memory in the temporal domain. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 989-998.
- Scott K (2005) Taste recognition: food for thought. *Neuron Review* **48**: 455-464.
- Sempo G, Deneubourg JL, Folcke G, Detrain C & Fresneau D (2007) Validation expérimentale de l'utilisation de la technologie RFID dans l'étude des dynamiques spatiales d'insectes grégaires. In: Le social dans tous ses états, colloque S.F.E.C.A. 2007, p 15.
- Siegel RW & Hall JC (1979) Conditioned responses in courtship behaviour of normal and mutant *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**(7): 3430-3434.
- Singh BN & Sisodia S (2000) Frequency-dependent selection: Minority male mating advantage in *Drosophila*. *Curr. Sci.* **78**(2): 141-150.
- Singh RN & Nayak SV (1985) Fine structure and primarily sensory projections of sensilla on the maxillary palp of *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **14**(5): 291-306.
- Singh RN (1997) Neurobiology of the gustatory systems of *Drosophila* and some terrestrial insects. *Microsc. Res. Tech.* **39**(6): 547-563.
- Sitaraman D, Zars M & Zars T (2007) Reinforcement pre-exposure enhances spatial memory formation in *Drosophila*. *J. Comp. Physiol.* **193**: 903-908.
- Siwicki KK & Ladewski L (2003) Associative learning and memory in *Drosophila*: beyond olfactory conditioning. *Behav. Processes* **64**: 225-238.
- Skiri HT, Strandén M, Sandoz JC, Menzel R & Mustaparta H (2004) Associative learning of plant odorants activating the same or different receptor neurones in the moth *Heliothis virescens*. *J. Exp. Biol.* **208**: 787-796.
- Skow CD & Jakob EM (2006) Jumping spiders attend to context during learned avoidance of aposematic prey. *Behav. Ecol.* **17**: 34-40.
- Squire LR (1992) Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol. Rev.* **99**(2): 195-231.
- Stach S, Benard J & Giurfa M (2004) Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature* **429**: 758-761.
- Stamps J, McElreath R & Eason P (2005) Alternative models of conspecific attraction in flies and crabs. *Behav. Ecol.* **16**, 974-980.

- Steidl S, Rose JK & Rankin CH (2003) Stages of memory in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* **2**(1): 3-14.
- Stephens PA, Sutherland WJ & Freckleton RP (1999) What is the Allee effect? *Oikos* **87**: 185-190.
- Stern K & McClintock MK (1998) Regulation of ovulation by human pheromones. *Nature* **392**(6672): 177-179.
- Stocker RF & Schorderet (1981) Cobalt filling of sensory projections from internal and external mouthparts in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* **216**(3): 513-523.
- Stocker RF, Lienhard MC, Borst A & Fischbach KF (1990) Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* **262**: 9-34.
- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissues Res.* **275**: 3-26.
- Stouffer EM & White NM (2005) A latent cue preference based on sodium depletion in rats. *Learn. Mem.* **12**: 549-552.
- Strausfeld NJ (1976) Atlas of an insect brain. Berlin/Heidelberg/New York/ Tokyo, Springer-Verlag, 214 p.
- Strausfeld NJ, Hansen L, Li Y, Gomez RS & Ito K (1998) Evolution, discovery and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn. Mem.* **5**: 11-37.
- Suh GSB, Wong AM, Hergarden AC, Wang JW, Simon AF, Benzer S, Axel R & Anderson DJ (2004) A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* **431**: 854-859.
- Svetec N & Ferveur JF (2005) Social experience and pheromonal perception can change male-male interactions in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **208**: 891-898.
- Symonds MRE & Wertheim B (2005) The mode of evolution of aggregation pheromones in *Drosophila* species. *J. Evol. Biol.* **18**: 1253-1263.

T

- Takahashi KH (2006) Spatial aggregation and association in different resource-patch distributions: experimental analysis with *Drosophila*. *J. Anim. Ecol.* **75**(1): 266-273.
- Takashi T, Kato K, Kamikouchi A & Ito K (2005) Analysis of distribution of the brain cells of the fruit fly by an automatic cell counting algorithm. *Physica A* **350**: 144-149.
- Takeda K (1961) Classical conditioned response in the honey bee. *J. Insect Physiol.* **6**: 168-179.
- Tammero LF & Dickinson MH (2002) The influence of visual landscape on the free flight behavior of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **205**: 327-343.

- Tang S & Guo A (2001) Choice behavior of *Drosophila* facing contradictory visual cues. *Science* 294(5546): 1543-1547.
- Tanimoto H, Heisenberg M & Gerber B (2005) Experimental psychology: event time turns punishment to reward. *Nature* 430: 983.
- Tauber E & Eberl DF (2003) Acoustic communication in *Drosophila*. *Behav. Processes* 64(2): 197-210.
- Tempel BL, Bonini N, Dawson DR and Quinn WG (1983) Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *Psychol.* 80: 1482-1486.
- Thorne N, Chromey C, Bray S & Amrein H (2004) Taste perception and coding in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 14(12): 1065-1079.
- Thum AS, Jenett A, Ito K, Heisenberg M & Tanimoto H (2007) Multiple memory traces for olfactory learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 27(41): 11132-11138.
- Tinette S, Zhang L & Robichon A (2004) Cooperation between *Drosophila* flies in searching behavior. *Genes Brain Behav.* 3(1): 39-50.
- Tinette S, Zhang L, Garnier A, Engler G, Tares S & Robichon A (2007) Exploratory behaviour in NO-dependent cyclase mutants of *Drosophila* shows defects in coincident neuronal signalling. *BMC Neurosci.* 8: 65
- Toma DP, Bloch G, Moore D & Robinson GE (2000) Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6914-6919.
- Tompkins L & Hall JC (1981) The different effects on courtship of volatile compounds from mated and virgin *Drosophila* females. *J. Insect. Physiol.* 27: 17-21.
- Tryon RC (1940) Genetic differences in maze learning ability in rats. *Yearb. Nat. Soc. Stud. Educ.* 39: 111-119.
- Tully T & Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol [A]* 157: 263-277.
- Tully T (1986) Measuring learning in individual flies is not necessary to study the effects of single-gene mutations in *Drosophila*: a reply to Holliday and Hirsch. *Behav. Genet.* 16(4):449-455.
- Tully T, Boynton S, Brandes C, Dura J-M, Mihalek R, Preat T & Vilella A (1990) Genetic dissection of memory formation in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 55: 203-211.
- Tully T, Preat T, Boynton SC & Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35-47.

U

- Ueda A & Kidokoro Y (2002) Aggressive behaviours of female *Drosophila melanogaster* are influenced by their social experience and food resources. *Physiol. Entomol.* **27**(1): 21-28.
- Unoki S, Matsumoto Y & Mizunami M (2005) Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *Eur. J. Neurosci.* **22**(6): 1409-1416.
- Unoki S, Matsumoto Y & Mizunami (2006) Roles of octopaminergic and dopaminergic neurons in mediating reward and punishment signals in visual learning. *Eur. J. Neurosci.* **24**(7): 2031-2038.

V

- van der Goes van Naters W & Carlson JR (2007) Receptors and neurons for fly odors in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **17**: 606-612.
- Vargo M & Hirsch J (1982) Central excitation in the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* **96**(3): 452-459.
- Vaysse G & Médioni J (1973) Premières expériences sur la gustation tarsale chez *Drosophila melanogaster*: stimulation par le saccharose. *C.R. Soc. Biol.* **167**(3-4): 560-564.
- Vaysse G & Médioni J (1976) Further experiments on the conditioning and pseudoconditioning of the tarsal reflex in the *Drosophila* (*Drosophila melanogaster*): effect of low intensity electric shocks. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* **170**(6): 1290-1304.
- Vaysse G (1982) Etude du réflexe tarsal et de son inhibition conditionnée chez *Drosophila melanogaster*: déterminants génétiques et épigénétiques. Diploma Thesis, Paul Sabatier University, Toulouse, France, 221 p.
- Vergoz V, Roussel E, Sandoz JC & Giurfa M (2007) Aversive learning in honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* **2**(3): e288.
- Vet LEM, van Lenteren JC, Heymans M & Meelis E (1983) An airflow olfactometer for measuring olfactory responses of hymenopterous parasitoids and the other small insects. *Physiol. Entomol.* **8**: 97-106.
- von Uexküll J (1934) Steifzüge durch die Umwelten von Tieren und Menschen. Hamburg, Rowholt. (1953) Traduction française, Mondes animaux et monde humain. Paris, Gonthiers.

W

- Waddell S & Quinn WG (2001) What can teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends. Genet.* **17**(12): 719-726.
- Wagner AR, Siegel S, Thomas E & Ellison GD (1964) Reinforcement history and the extinction of a conditioned salivary response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **58**: 354-358.

- Wagner U, Gais S, Haider H, Verleger R & Born J (2004) Sleep inspires insight. *Nature* **427**(6972): 352-355.
- Wang L, Dankert H, Perona P & Anderson DJ (2008) A common genetic target for environmental and heritable influences on aggressiveness in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**(15): 5657-5663.
- Wang Y, Chiang AS, Xia S, Kitamoto T, Tully T & Zhong Y (2003) Blockade of neurotransmission in *Drosophila* mushroom bodies impairs odor attraction, but not repulsion. *Curr. Biol.* **13**: 1900-1904.
- Wang Y, Guo HF, Pologruto TA, Hannan F, Hakker I, Svoboda K & Zhong Y (2004) Stereotyped odor-evoked activity in the mushroom body of *Drosophila* revealed by green fluorescent protein-based Ca^{2+} imaging. *J. Neurosci.* **24**(29): 6507-6514.
- Wang Z, Singhvi A, Kong P & Scott K (2004) Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell* **117**(7): 981-991.
- Warrington EK & Weiskrantz L (1968) New method of testing long-term retention with special reference to amnesiac patients. *Nature* **217**: 972-974.
- Watt PJ, Nottingham SF & Young S (1997) Toad tadpole aggregation behaviour: evidence for a predator avoidance function. *Anim. Behav.* **54**: 865-872.
- Wehner R, Michel B & Antonsen P (1996) Visual navigation in insects: coupling of egocentric and geocentric information. *J. Exp. Biol.* **199**: 129-140.
- Weldon MS & Bellinger KD (1997) Collective memory: collaborative and individual processes in remembering. *J. Exp. Psychol. Learn. Mem. Cogn.* **23**: 1160-1175.
- Wertheim B (2001) Ecology of *Drosophila* aggregation pheromone. A Multitrophic approach. PhD dissertation, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Wertheim B, Marchais J & Vet LEM (2002) Allee effect in larval resource exploitation in *Drosophila*: an interaction among density of adults, larvae and micro-organisms. *Ecol. Entomol.* **27**: 608-617.
- Wertheim B, van Baalen EJA, Dicke M & Vet LEM (2005) Pheromone-mediated aggregation in nonsocial arthropods: an evolutionary ecological perspective. *Annu. Rev. Entomol.* **50**: 321-346.
- Wertheim B, Allemand R, Vet LEM & Dicke M (2006) Effects of aggregation pheromone on individual behaviour and food web interactions: a field study on *Drosophila*. *Ecol. Entomol.* **31**(3): 216-226.
- Whitehouse MEA (1997) Past experience influences male-male contest in the spider *Argyroda antipodiana* (Theridiidae: Araneae). *Anim. Behav.* **53**: 913-923.
- Wilson EO (1975) Sociobiology, The abridged Edition. Cambridge, Mass., The president and fellows of Harvard College.

- Wilson RA (2005) Collective memory, group minds, and the extended mind thesis. *Cogn. Process* **6**: 227-236.
- Wiskerke JSC, Dicke M & Vet LEM (1993) Larval parasitoid uses aggregation pheromone of adult hosts in foraging behaviour: a solution to the reliability-detectability problem. *Oecologia* **93**: 145-148.
- Wolf FW, Rodan AR, Tsai LTY & Heberlein U (2002) High resolution analysis of ethanol-induced locomotor stimulation in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **22**(24): 11035-11044.
- Wolf R, Wittig T, Liu L, Wustmann G, Eyding D & Heisenberg M (1998) *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile and motor learning. *Learn. Mem.* **5**(1-2): 166-178.
- Worden BD & Papaj DR (2005) Flower choice copying in bumblebees. *Biol. Lett.* **1**(4): 504-507.
- Wu QI, Wen T, Lee G, Park JH, Cai HN & Shen P (2003) Developmental control of foraging and social behaviour by the *Drosophila* neuropeptide Y-like system. *Neuron* **39**: 147-161.
- Wustmann G, Rein K, Wolf R & Heisenberg M (1996) A new paradigm for operant conditioning of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol. A* **179**: 429-436.
- Wustmann G & Heisenberg M (1997) Behavioral manipulation of retrieval in a spatial memory task for *Drosophila melanogaster*. *Learn. Mem.* **4**: 328-336.

X

- Xu P, Atkinson R, Jones DN & Smith DP (2005) *Drosophila* OBP LUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron* **45**: 193-200.
- Xu J, Sornborger AT, Lee JK & Shen P (2008) *Drosophila* TRPA channel modulates sugar-stimulated neural excitation, avoidance and social response. *Nat. Neurosci.* **11**(6): 676-682.

Y

- Yaron-Antar A & Nachson I (2006) Collaborative remembering of emotional events: the case of Rabin's assassination. *Memory* **14**: 46-56.
- Yin JC, Wallach JS, Del Vecchio M, Wilder EL, Zhou H *et al.* (1994) Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**: 49-58.
- Yu D, Ponomarev A & Davis RL (2004) Altered representation of the spatial code for odors after olfactory classical conditioning: memory trace formation by synaptic recruitment. *Neuron* **42**: 437-449.

Yu D, Keene AC, Srivatsan A, Waddell S & Davis RL (2005) *Drosophila* DPM neurons form a delayed and branch-specific memory trace after olfactory classical conditioning. *Cell* **123**(5): 945-957.

Yu D, Akalal DB & Davis RL (2006) *Drosophila* alpha/beta mushroom body neurons form a branch-specific, long-term cellular memory trace after spaced olfactory conditioning. *Neuron* **52**: 845-855.

Yurkovic A, Wang O, Basu AC & Kravitz EA (2006) Learning and memory associated with aggression in *Drosophila melanogaster*. *PNAS* **103**(46): 17519-17524.

Z

Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Prentice Hall; Upper Saddle River, N.J. (USA). 663 p.

Zars T, Fischer M, Schulz R & Heisenberg M (2000) Localisation of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* **288**(5466): 672-675.

Zhang KE, Guo JZ, Peng Y, Xi W & Guo A (2007) Dopamine-mushroom body circuit regulates saliency-based decision-making in *Drosophila*. *Science* **316**: 1901-1904.

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

Figure 1: Cycle de développement de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
Figure 2: Exemple de comportements agressifs pouvant être observés lors d'un combat entre mâles compétiteurs en présence d'une femelle et d'une source limitée de nourriture.....	51
Tableau 1: Synthèse des comportements sociaux et des phénomènes de facilitation sociale et de coopération découverts jusqu'à présent chez <i>Drosophila melanogaster</i>	63
Figure 3: Organisation du système chemosensoriel chez <i>Drosophila melanogaster</i>	65
Figure 4: Schéma des corps pédonculés et des tractus antenno-glomérulaires de la drosophile.....	67
Figure 5: Appareillages de conditionnement et de test pour le paradigme de conditionnement appétitif de préférences olfactives.....	70
Figure 6: Appareillage de conditionnement de l'inhibition du réflexe d'extension du proboscis.....	71
Figure 7: Séquence des comportements pendant la parade sexuelle d'un mâle de drosophile.....	72
Figure 8: Conditionnement visuel en simulateur de vol.....	73
Figure 9: Courbes de rétention des différents types de mémoire.....	75
Figure 10: Les deux modèles de phases de mémoire chez la drosophile.....	77

MATERIELS ET METHODES GENERAUX

Figure 11: Appareillage expérimental de l'ECP chez la drosophile.....	96
Figure 12: Schéma du barillet de conditionnement utilisé pour le conditionnement olfactif aversif des drosophiles.....	102
Figure 13: Schéma de l'appareil de test en T utilisé pour le test d'évitement de l'odeur conditionnée.....	103
Figure 14: Dispositif de l'olfactomètre à 4 voies.....	108

RESULTATS

Figure 15: Pourcentage d'activité spontanée du proboscis plus élevé en début de thèse qu'en DEA.....	117
Figure 16: Performances d'apprentissage et de MCT de drosophiles CS après application du protocole de conditionnement espacé de l'ECP.....	120
Figure 17: Analyse de la mortalité en fonction des milieux de jeûne et de diète.....	121
Figure 18: Essais de différents types de conditionnement et de test.....	123
Figure 19: Performances des mouches en fonction de la durée restée en contention avant le conditionnement.....	124
Figure 20: Recherche des concentrations maximums de OCT et MCH permettant de ne plus engendrer de répulsion par rapport à de l'air chez des mouches naïves en olfactomètre à 4 voies....	157
Figure 21: Attractivité pour l'odeur de vinaigre de cidre dans l'appareil de test en T et l'olfactomètre à 4 voies.....	158

Tableau 2: Scores de MCT et MLT aversives en fonction de la concentration des odeurs utilisées pour le conditionnement et pour le test en olfactomètre.....	160
Figure 22: Scores de MLT à 24 heures en groupe, en fonction de l'éclairage utilisé: éclairage habituel (ampoule rouge) ou éclairage sur table lumineuse.....	185
Figure 23: Représentation schématique de la machine de test en T.....	186
Figure 24: Analyse de l'attractivité sexuelle comme facteur potentiel de l'effet de groupe en MRA.....	218
Figure 25: Recherche de l'implication de signaux visuels dans l'augmentation du score de MRA en groupe entre 1 et 3 min.....	220
Figure 26: Recherche d'un signal auditif produit par les ailes à l'origine de l'augmentation du score de MRA en groupe entre 1 et 3 min de test.....	222
Figure 27: Schéma général de l'appareil de test avec rajout de tubes « sources ».....	224
Figure 28: Test d'attraction/répulsion des mouches conditionnées en MRA sur des mouches naïves.....	226
Figure 29: Score de MRA à 1 et 3 min de test obtenu 24 h après un conditionnement aversif en 1 cycle et 5 cycles massés.....	227

ANNEXES

Figure 30: Arbre phylogénétique des relations dans l'évolution entre 28 des espèces connues de drosophiles.....	287
---	-----

ARTICLE N°1

Figure 1: Observation of proboscis movements in <i>Drosophila</i>	132
Figure 2: Olfactory appetitive conditioning (Experiment 1): associative learning of a WT strain and learning defect of the <i>rutabaga</i> strain.....	136
Figure 3: Olfactory appetitive conditioning (Experiment 2): associative learning and short-term memory in WT flies.....	137
Figure 4: Effect of low-sugar diets and starvation on mortality.....	139
Figure 5: Effect of trehalose diet vs. starvation on learning and memory performance.....	141
Table 1. Comparison of responsiveness to tarsal stimulation with sucrose (US) between starved flies and trehalose-fed flies.....	142
Table 2. Responsiveness of naive flies to odours of octanol, banana, cider vinegar and to a non-odorant airflow.....	143

ARTICLE N°2

Figure 1. Barrel-type apparatus for odor-sugar associative conditioning.....	168
Figure 2. Sugar responsiveness and 1h30 memory score as a function of starvation length.....	171
Figure 3. Associative learning, and time-course of memory within 24 h after a single conditioning session.....	171

Figure 4. Time-course of memory over days, as a function of number and spacing of conditioning sessions.....	172
Table 1. Sugar responsiveness in <i>Canton S</i> and mutant flies.....	173
Figure 5. Effect of the protein-synthesis inhibitor on memory scores tested at short- and long-term depending on number and spacing of the conditioning sessions.....	174
Table 2. Control for sugar responsiveness after CXM treatment.....	175
Table 3. Control for odor responsiveness after CXM treatment.....	175

ARTICLE N°3

Figure 1: ARM is a cooperative memory and LTM a strong individual memory in <i>Drosophila</i>	190
Figure 2: The positive group effect observed in ARM-trained flies is not due to learning context...	191
Figure 3: The positive group effect observed in ARM-trained flies is not due to non-specific aggregation.....	193
Figure 4: Social facilitation of memory retrieval involves specific interactions occurring among trained flies.....	194

ARTICLE N°4

Figure 1: Mean individual memory performance.....	204
Table 1: Distribution of individual memory scores.....	205
Figure 2: Evolution of the individual memory score along the test.....	206
Figure 3: Effect of the first choice on the evolution of the individual memory score.....	207
Figure 4: Number of odour changes in function of the first choice.....	209
Table 2: Evolution of the percentage of time spent in pause during the test.	210
Table 3: Percentage of time spent in pause in both odours.....	211
Table 4: Time spent in proximal and distal zones of the T-maze arms in function of the odours.....	211
Figure 5: Evolution of group memory scores along the test.....	212

TABLE DES ABREVIATIONS

ACP: Activité Conditionnée du Proboscis

CP: Corps Pédonculés

CS: *Canton-Spécial* (souche de drosophile de référence au laboratoire)

cVA: cis-Vaccinil Acetate

DEA: Diplôme d'Etude Approfondie

DEPSN: laboratoire « Développement, Evolution, Plasticité du Système Nerveux » (Gif-sur-Yvette)

DPM: *Dorsal Paired Medial neurons*

ECP: Extension Conditionnée du Proboscis

et al.: et collaborateurs

GDSM: laboratoire « Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire » (ESPCI, Paris)

IP: Indice de Performance

LEGS: « Laboratoire Evolution, Génomes et Spéciation » (Gif-sur-Yvette)

LNCI: « Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés » (anciennement à Bures-sur-Yvette)

MCH: odeur 4-méthyl-cyclohexanol

MCT: Mémoire à Court Terme

MLT: Mémoire à Long Terme

MMT: Mémoire à Moyen Terme

MRA: Mémoire Résistante à l'Anesthésie

NPY-like: Homologue du Neuropeptide Y

NBCM: laboratoire « NeuroBiologie Cellulaire et Moléculaire » (Gif-sur-Yvette)

OCT: odeur 3-octanol

RC: Réponse Conditionnelle

RI: Réponse Inconditionnelle

SC: Stimulus Conditionnel

SFECA: Société Française pour l'Etude du Comportement Animal

SI: Stimulus Inconditionnel

vs: *versus*

ANNEXES

ARBRE PHYLOGENETIQUE DES DROSOPHILES

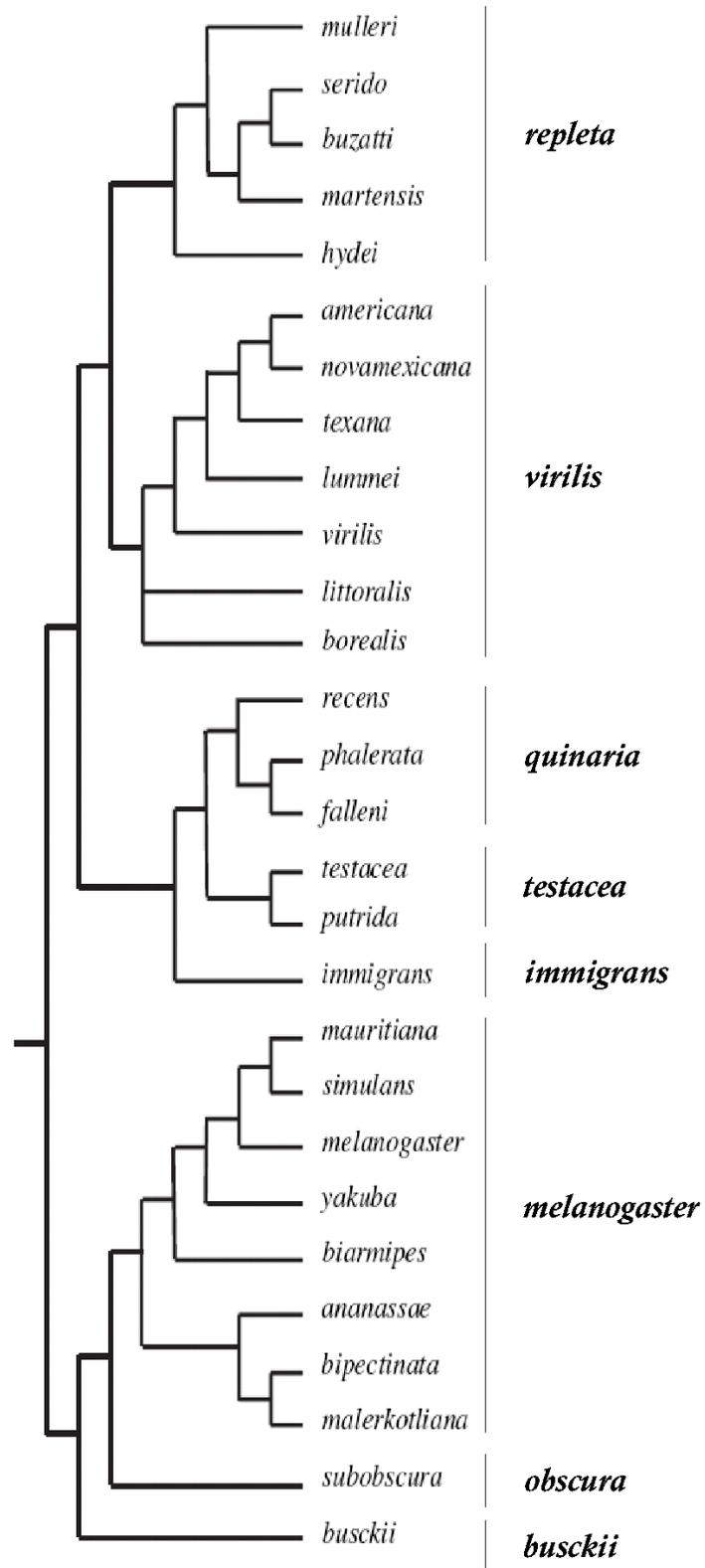


Figure 30: Arbre phylogénétique des relations dans l'évolution entre 28 des espèces connues de drosophiles (Source: Symonds et Wertheim 2005).



Marie-Ange CHABAUD

27 ans, mariée, 1 enfant

✉ : 5 Résidence Tournemire, 91940 Les ULIS

☎ : 06 79 82 30 36

🌐 : marie.ange.chabaud@free.fr

CURRICULUM VITAE

COMPETENCES

• SCIENCE et ETHOLOGIE

Méthodologie : définition des objectifs et des hypothèses, élaboration de protocoles expérimentaux novateurs, expérimentations, observation et encodage des comportements, analyses statistiques, interprétation des résultats.

Techniques : tests comportementaux, génétique, dissection, manipulations microscopiques. Bases en phylogénie, biochimie, biologie moléculaire et électrophysiologie.

• GESTION DE PROJET

- Définition du cahier des charges et du plan de projet, établissement des partenaires, évaluation des besoins, du coût en ressources et du temps nécessaire.

- Réalisation du projet pilote, suivi de planification, réunions d'équipe.

- Diffusion des résultats : rédaction de rapports, présentation en congrès (orale et affichée), publication dans des revues internationales.

- Veille scientifique et technologique, participations à l'encadrement de stagiaires (collège, licence).

• INFORMATIQUE

- System : Windows 2000, XP

- Bureautique : Word, Excel, Internet, Outlook, Eudora.

- Logiciels : Endnote (synthèse bibliographique), The Observer (analyse du comportement), Excel, Statview, Statistica, StatXact, Statgraphics (statistiques), Broadway (montage vidéo), Photoshop, Paint.

• LANGUES

Anglais (scientifique et technique), Allemand (à réactiver).

AUTRES EXPERIENCES

• Activités associatives :

Membre de la SFECA (*Société Française pour l'Etude du Comportement Animal*) 2005-2007

Bureau de conseil syndical (Les Ulis) 2004-2008

Bureau de l'association BEBOP (*Biologie des Ecosystèmes, et des Organismes et des Populations*) (Poitiers) 2001-2002

• Divers emplois saisonniers :

Agent de commerce, Géant Casino 2001

Technicien de production, Schneider Electric 1999-2002

• **Loisirs** : piano, créations artisanales, randonnées, voyages culturels et écologiques.

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

• CHERCHEUR APPRENTI (Doctorat) 4 ans

CNRS Gif-sur-Yvette (78), Laboratoire DEPSN.
Laboratoire Développement, Evolution et Plasticité du Système Nerveux.

ESPCI Paris (75), Laboratoire GDSM.
Laboratoire Genes et Dynamique des Systèmes de Mémoire.

Projet : "Développement de conditionnements appétitifs et analyse des performances mnésiques individuelles et collectives en contextes appétitif et aversif chez la drosophile"

• CHERCHEUR STAGIAIRE (Master) 8 mois

INRA Bures-sur-Yvette (91), Laboratoire LNCl.
Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés.

Projet : "Mise au point du conditionnement olfactif de l'extension du proboscis chez la drosophile."

• CHERCHEUR STAGIAIRE (Maîtrise) 6 mois

CNRS Dijon (21), Laboratoire Développement et Communication Chimique.

Projet : "Cartographie fonctionnelle des régions du cerveau impliquées dans le comportement de réceptivité des drosophiles femelles lors de la parade sexuelle."

FORMATION

DOCTORAT de Biologie du Comportement 2008

Université Paris 13 (93), bourse du ministère, mention très honorable avec félicitations du jury.

MASTER de Biologie du Comportement 2003

Université Paris 13 (93), mention B, classée 2è.

MAITRISE de Biologie des Populations et des Ecosystèmes 2002

Université Poitiers (86), mention AB.

LICENCE de Biologie des Organismes et des Populations 2001

Université Poitiers (86), mention AB.

DEUG de Sciences de la vie et de la Terre 2000

Université Poitiers (86), mention AB.

BACCALAUREAT S, option Biologie 1998

Lycée Guez de Balzac, Angoulême (16), mention AB.

PUBLICATIONS

- CHABAUD MA, DEVAUD JM, PREAT T, PHAM-DELEGUE MH & KAISER L (2006)
Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A* 192: 1335-1348.
- CHABAUD MA, ISABEL G, KAISER L, PREAT T
Social facilitation of long-lasting memory retrieval in *Drosophila*. (en révision pour re-soumission à *Curr. Biol.*).
- CHABAUD MA, KAISER L & PREAT T
Characterisation of individual olfactory performances in *Drosophila melanogaster*. (en préparation pour soumission à *J. Exp. Biol.*).
- COLOMB J, KAISER L, CHABAUD MA & PREAT T
New insights into *drosophila* appetitive long-term memory and sugar motivation. (nouvellement accepté à *Genes Brain Behav.*)
- CHABAUD MA & KAISER L
Social life in *Drosophila*: a new model to address mechanisms, evolution and disorder of social behaviours. (en préparation pour soumission).

REFERENCES

Dr Thomas PREAT CNRS
Laboratoire Gènes et Dynamique des Systèmes de
Mémoire, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris
01 40 79 45 54 - thomas.preat@espci.fr

Dr Laure KAISER-ARNAULD INRA/CNRS
Laboratoire Evolution, Génome et Spéciation
Bât 13B avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette
01 69 82 37 04 - kaiser@inaf.cnrs-gif.fr

COMMUNICATIONS

- CHABAUD MA (2008) Social behaviours in *Drosophila* and influence of group on their olfactory memory (Communication orale).
Séminaire Laboratoire Evolution, Génétique et Spéciation, Gif-sur-Yvette, 21 novembre 2008
- CHABAUD MA, ISABEL G, KAISER L & PREAT T (2007) Mémoire collective et individuelle chez la drosophile (Communication orale et résumé). Colloque SFCEA « Le social dans tous ses états », Villetaneuse, 18-20 avril 2007
- CHABAUD MA, DEVAUD JM, PREAT T, PHAM-DELEGUE MH & KAISER L (2006) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster* (Communication orale et résumé).
Congrès International Neurofly « 11th European *Drosophila* Neurobiology Conference », Louvain (Belgique), 2-6 septembre 2006.
- CHABAUD MA, DEVAUD JM, PREAT T, PHAM-DELEGUE MH & KAISER L (2006) Conditionnement olfactif de l'activité du proboscis chez *Drosophila melanogaster* (Communication orale et résumé).
Club Neurobiologie des Invertébrés (7^{ème} rencontre) Cassis, 23-24 mars 2006
- CHABAUD MA, DEVAUD JM, PREAT T, PHAM-DELEGUE MH & KAISER L (2005) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster* (Poster).
Colloque GDR Neurosciences de la Mémoire, Lyon, 13-14 septembre 2005
- CHABAUD MA, DEVAUD JM, PREAT T, PHAM-DELEGUE MH & KAISER L (2005) Olfactory conditioning of proboscis activity in *Drosophila melanogaster* (Poster).
Club Neurobiologie des Invertébrés (6^{ème} rencontre) Bagnolet, 16-17 juin 2005
- CHABAUD MA (2005) Synthèse des travaux sur les récepteurs nicotiques chez le rat et leur implication dans les mécanismes de l'addiction (Communication orale).
Journal club de l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard, Gif-sur-Yvette, février 2005

**DEVELOPMENT OF APPETITIVE CONDITIONINGS AND ANALYSIS OF
INDIVIDUAL AND GROUP MEMORY PERFORMANCES IN APPETITIVE AND
AVERSIVE CONTEXTS IN *DROSOPHILA*.**

ABSTRACT

The fruit fly *Drosophila* is commonly employed as an experimental model to study memory, with an aversive conditioning, using flies in group. To compare memory processes in aversive and appetitive contexts, we developed two olfactory appetitive conditionings, of proboscis activity with fruit flies in contention, and of olfactory preference in group. Both induce associative learnings, dependent of food motivation. The first one, innovative, uses flies in contention with the perspective of *in vivo* imaging of neuronal activity. The second produces long term appetitive memory, formed by potentially different processes than those of the aversive memory, and which are currently investigated. These achievements offer the perspective to approach experimentally motivational regulation processes of memory. Then, by a comparative analysis of individual and group performances of the aversive memory, we found differences in individual behaviours between two forms of aversive consolidated memories known in *Drosophila*, the “long term memory” and the “anaesthesia resistant memory” (ARM), and social facilitation of ARM performance, of which mechanisms are being studied. These results and a review of social behaviours in *Drosophila* bring elements allowing considering *Drosophila* as species with a certain sociality, to include in investigations of the evolution of sociality.