



HAL
open science

Rôle des récepteurs nicotiques dans différentes formes de mémoire chez l'abeille *Apis mellifera*

Matthieu Dacher

► **To cite this version:**

Matthieu Dacher. Rôle des récepteurs nicotiques dans différentes formes de mémoire chez l'abeille *Apis mellifera*. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2005. Français. NNT: . tel-00529094

HAL Id: tel-00529094

<https://theses.hal.science/tel-00529094>

Submitted on 25 Oct 2010

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

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

UNIVERSITÉ TOULOUSE III - PAUL SABATIER
UFR SCIENCE DE LA VIE ET DE LA TERRE

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ TOULOUSE III

Disciplines : Neurosciences et Biologie du Comportement

présentée et soutenue

par

Matthieu DACHER

le 1^{er} septembre 2005

Titre :

**RÔLE DES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES DANS DIFFÉRENTES FORMES
DE MÉMOIRE CHEZ L'ABEILLE *APIS MELLIFERA***

Directrice de thèse :

Monique GAUTHIER

JURY

M. Martin GIURFA, professeur à l'Université Toulouse III	Président
M. Bernard FRANCÉS, professeur à l'Université Toulouse III	Examineur
M. Thomas PRÉAT, directeur de recherches à Gif-sur-Yvette	Examineur
M. Raymond CHICHERY, professeur à l'Université de Caen	Rapporteur
M. Yves LE CONTE, directeur de recherches à Avignon	Rapporteur
Mme Monique GAUTHIER, professeur à l'Université Toulouse III	Directrice

REMERCIEMENTS

*Il est un bon usage, en thésiennes rédactions :
Celui de rendre grâce, en tête de l'écrit,
Aux nobles gentilhommes, aux dames pleines d'attentions,
A ceux quy par leurs actes, m'amènent à dire mercy.
Icelles actions de grâce, iceux remerciements,
Ne sont point convenances, encore moins boniments,
Mais vray reconnaissance, et justes compliments.
Les voicy quy commencent, par maistres du jugement.
A vous aussy, ô apidologiques confrères,
Je souhaiterai présenter un hommage appuyé :
Tous unis, tous ensembles, portant la même bannière,
Rassemblés d'un seul cœur, d'Abeilles les écuyers.
Cognition animale, voicy noble sujet !
Vous belles damoiselles, vous gentils chevaliers,
Dont l'esprit de la beste des recherches est l'objet,
Je vous fais mes adieux, nous quy étions alliés.
Après toute cette parlure, encrant tout ce papier,
Il me faut tous mes proches, remercier également,
Par alliance contractée, ou bien par lien du sang,
Ou bien même amitié aux fidèles équipiers.*

C'est en exprimant ma gratitude à **Martin Giurfa** que je commencerai ces remerciements. Je suis heureux et honoré qu'il soit président de mon jury de thèse, et je le remercie également pour le travail qu'il accomplit en tant que directeur de notre laboratoire.

Je remercie également **Raymond Chichery**, que j'avais rencontré avant même le début de mon DEA et que j'ai recroisé plusieurs fois par la suite, ce qui m'a conduit à faire appel à lui pour évaluer mon manuscrit. A cette occasion, j'ai une nouvelle fois constaté votre sérieux scrupuleux et bienveillant. Je souhaite également remercier **Yves Le Conte**, le second rapporteur de ma thèse, dont j'ai pu apprécier les commentaires pertinents, signes d'une lecture méticuleuse. J'associe à ces remerciements **Thomas Prémat** et **Bernard Francés**, qui ont bien voulu juger ce travail.

Il est essentiel dans ces remerciements de mettre en valeur le rôle de **Monique Gauthier**, ma directrice de thèse. Notre travail commun a été fructueux, de l'écriture du premier article jusqu'à la rédaction de la thèse (et en particulier de l'introduction), et je ne saurais lui exprimer suffisamment ma reconnaissance pour ce que j'ai pu devenir grâce à elle.

Je souhaite remercier le groupe abeille dans son ensemble pour son amitié et son support : **Sandrine Paute** pour son aide technique, **Valérie Raymond-Delpech** pour les nombreux apports théoriques fait à mon travail, **Cathy Armengaud** pour nos travaux en commun, **Michel Lambin** pour sa sagesse bienveillante et son aide pour la réalisation des photos de ce travail, **Maria-Gabriela de Brito-Sanchez** pour la gaieté introduite dans notre bureau, **Steeve Thany** notre courageux moléculiste, **Vincent Garry** le dernier rempart des abeilles face au fipronil, le vaillant pompier algérien **Hicham Kacimi** (nouvelle preuve de l'œcuménisme de notre équipe) et **Tristan Jaillard** son pyromane collègue. De nombreux stagiaires ont eu l'occasion de travailler avec moi : **Aurélié**, **Jean-Baptiste**, **Amélie**, **Maude** et **Pierre**, merci d'avoir accepté pour quelques semaines de subir à mes côtés les dommages collatéraux de ma thèse. Bonne continuation dans vos études respectives.

Avec beaucoup de chaleur, je souhaite remercier tout particulièrement **Patrice Déglise** et **Guillaume Barbara**, ainsi bien sûr que **Delphine** et **Sabrina**. Outre le soutien mutuel que nous nous sommes portés, je veux aussi rendre hommage à vos qualités scientifiques et humaines et à votre amitié que j'ai pu apprécier tout au long de ces années.

Je poursuis mes remerciements avec le reste du groupe abeille ; merci donc à **Jean-Marc Devaud**, **Jean-Christophe Sandoz**, **Nina Deisig**, **Edith Roussel** et **Isabelle Massou**. A **Marco Schubert**, **Fernando « Mordi » Guerrieri**, **Fabienne Dupuy**, **Vanina Vergoz**, **Julie Bénard** et **Yukihisha Matsumoto**, je souhaite bon courage et bonne continuation, avec des remerciements spéciaux pour tous les souvenirs ramenés du colloque de Nyborg. De façon un peu plus formelle, je remercie également Yuki pour m'avoir fourni le L-NAME et le D-NAME que j'ai utilisé dans ce travail.

Enfin, je n'oublie pas parmi mes collègues tous ceux qui travaillent sur des « honigbienen » plutôt que sur l'abeille. Je remercie donc **Joachim Erber** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant six semaines et **Ricarda Scheiner** pour ses conseils sur les expériences de sensibilité au sucre. Il me faut aussi remercier **Bernd Grünwald** pour sa collaboration avec notre équipe. Enfin, **Stephan Shuishi Haupt**, je ne sais comment te remercier pour ton soutien sans faille durant mon séjour berlinois, et aussi pour les informations partagées sur l'habitation.

Jean-Michel Lassalle, mérite un triple remerciement, en tant que responsable du DEA « Neurosciences, Comportement, Cognition » grâce auquel mes travaux ont commencé, de l'antenne de l'école doctorale CLESCO et de la commission des thèses qui a validé ce travail. Je veux donner un remerciement particulier et très chaleureux à **Christian Jost**. Dans pratiquement tous les modules où je suis intervenu lors de mes cours, tu étais à mes côtés pour me conseiller et m'encadrer. Tu es avec Monique et dans le domaine de l'enseignement l'un des principaux formateurs de mes années de thèse.

Je remercie également **Pascal Roulet** pour les conversations que nous avons eues et qui m'ont éclairé sur certains points concernant la mémoire, et **David Macquart** et **Sébastien Daly-Schweitzer** pour les pauses salutaires que nous avons partagées ensemble. Il serait un peu fastidieux d'énumérer **tous les membres passés et présents du Centre de Recherches sur la Cognition Animale**. C'est donc collectivement que je vous remercie pour toutes ces années passées ensemble. Vous me manquerez.

Khalid Lamine, merci pour ta sollicitude et ta gentillesse. **Jacques Lauga** m'a beaucoup appris sur le monde des statistiques. Je ne peux donc que le remercier pour le patrimoine qu'il m'a laissé.

Didier Jourdan, **Stéphane Boghossian** et **Josette Alliot** méritent des remerciements particulièrement chaleureux. C'est en effet à vos côtés il y a six ans déjà que j'ai commencé mon métier de chercheur. Si j'arrive au terme de mes études aujourd'hui (mais y arrive t-on jamais ?), c'est à cause de la solidité et de la rigueur des bases que j'ai découvertes grâce à vous.

Mes chers parents, cette thèse est un peu votre petite fille ; du début à la fin vous en avez suivi la gestation avec opiniâtreté en prodiguant toujours aides et encouragements lorsqu'il le fallait. Je vous suis reconnaissant, et ma piété filiale est à la mesure de tout ce que vous avez fait pour moi depuis le commencement.

Pour avoir été avec constance et affection à mes côtés pendant tout ce temps, merci également à **toute ma famille**. Toutes nos réunions sont autant d'excellents souvenirs pour tenir dans les moments difficiles, et votre affection, votre soutien et votre curiosité pour mes étranges occupations sont de formidables appuis pour moi.

A vous tous, ex-membres de ma **promotion de DEA**, mille mercis ... Bien que j'ai une pensée pour chacun de vous, je souhaite adresser en particulier mes remerciements à **Adeline** pour notre complicité téléphonique.

Merci aussi à **Juliette** et **Anne-Sophie**, grâce à qui j'ai pu découvrir des thèses vétérinaires, ainsi qu'à **Pascal**. Enfin, merci à mes vieux amis **Adrien**, **Bruno**, **Jacques**, **Jean-Cyrille**, **Jean-Marc** et **Xavier** (sans oublier **Nancy**, **Hélène**, **Alexandra**, **Angélique**, **Françoise** et **Takako**) pour tous ces bons moments passés ensemble.

Un dernier message pour les abeilles : certes, j'ai disposé de beaucoup de vos consœurs, mais de votre côté vous avez essayé de me tuer à plusieurs reprises. C'était de bonne guerre, alors sans rancune ! Je présente également mes excuses à tous les ordinateurs insultés durant la préparation de ce manuscrit et de mes articles.

* * * * *

Différents aspects de mon travail (et notamment des voyages pour des colloques ou des formations) ont été financés par les organismes suivants : l'Université Paul Sabatier - Toulouse III (bourse ATUPS), l'Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques, le Ministère de l'Agriculture, de la Pêche et des Affaires Rurales (financement Oniflhor), la Société Française pour l'Étude du Comportement Animal et l'École Normale Supérieure de Lyon. Toutefois, l'essentiel de mes travaux a été financé par mes parents, que j'honore donc une nouvelle fois en concluant ces remerciements.

1. Insecte qui produit le miel et la cire, et qui appartient au genre des insectes hyménoptères. Un essaim d'abeilles se compose d'une femelle, de mâles et de neutres ou ouvrières ; les femelles et les neutres sont armés d'un aiguillon long d'environ deux lignes. L'aiguillon de l'abeille reste presque toujours dans la piqûre, si l'insecte a été chassé brusquement. L'abeille recueille le miel dans les fleurs.

Comme on voit les frelons, troupe lâche et stérile,

Aller piller le miel que l'abeille distille.

BOILEAU Sat. I.

Les lieux où croît l'encens, où murmure l'abeille.

DUCIS. Abuf. I, 5.

Je suis chose légère et semblable aux abeilles,

A qui le bon Platon compare nos merveilles.

LA FONT. Ép. à Huet.

Et semblable à l'abeille en nos jardins éclore,

De différentes fleurs j'assemble et je compose

Le miel que je produis.

J. B. ROUSS. Ode au C. de Luc.

Le ruisseau n'apprend pas à couler dans sa pente,

L'aigle à fendre les airs d'une aile indépendante,

L'abeille à composer son miel.

LAMART. Nouv. méd. V.

Et que mes doux regards soient suspendus au tien,

Comme l'abeille avide aux feuilles de la rose.

ID. ib. X.

2. La reine des abeilles. Autrefois on croyait que c'était un roi.

Jusqu'au son de sa voix [de Louis XIV] et à l'adresse et à la grâce naturelle et majestueuse de toute sa personne le faisaient distinguer jusqu'à sa mort comme le roi des abeilles.

SAINT-SIMON 406, 68.

3. Le manteau impérial et les armoiries de Napoléon étaient semés d'abeilles d'or. Aussi a-t-on dit quelquefois les abeilles pour l'Empire.

4. Constellation australe qu'on nomme aussi Mouche indienne.

HISTORIQUE.

XIII^e s.

Et se il trovent aucun emblant ées [abeilles] en la forest, cil qui i seront trové feront au seigneur soixante sols d'amende.

DU CANGE, apicularii.

Il m'avironnerent aussi comme es.

Psaatier, f. 143.

XV^e s.

Le suppliant et Colin trouverent une bezanne [ruche] d'abeulles, la levèrent et en prirent tout le coupeau et le miel de dedans.

DU CANGE, besana.

Une multitude d'avilles, ce sont mouches qui font la cire et le miel.

ID. avillarium

XVI^e s.

Les ruches sont pleines quand les abeilles chassent opiniastrement de leurs ruches les frelons ou abeillauds.

OL. DE SERRES, 447.

Les abeilles ou avettes, les guespes, les frelons.

PARÉ, 23, 34.

Ainsi qu'au mois d'avril, on voit de fleur en fleur,

De jardin en jardin, l'ingénieuse abeille

Voletter et piller une moisson vermeille.

RONs. Sonn. à des Caurres

ÉTYMOLOGIE.

Berry, *avette* ; picard, *ès*, *eps* ; provençal *abelha* ; espagnol *abeja* ; italien *ape*. L'italien *ape*, l'ancien français *ée*, le picard *ès*, *eps* viennent de *apis* ; le berry vient d'un diminutif en *ette*, *apette* ou *avette* ; le français, le provençal et l'espagnol d'un diminutif *apicula*. Dès les premiers temps du bas-latin, on trouve une tendance à substituer le *b* au *p* du mot primitif ; par ex. De furtis abium, *Lex Sal.* LASPEYRES, p. 2

TABLE DES MATIÈRES

TITRE	1
REMERCIEMENTS	3
L'ABEILLE SELON LITTRÉ	9
TABLE DES MATIÈRES	11
LISTE DES ABRÉVIATIONS	17
INTRODUCTION	19
De la faculté de connaître ...	20
Quelques concepts importants dans l'étude de la mémoire	21
Plasticité du comportement chez quelques invertébrés	22
<i>L'orientation spatiale chez l'araignée</i>	23
<i>La résolution de problèmes chez la pieuvre</i>	23
<i>La navigation chez les insectes</i>	24
<i>Les performances de l'abeille dans la nature</i>	24
Plasticité du système nerveux chez quelques invertébrés	25
<i>Un réseau nerveux très réduit : plasticité des 302 neurones du nématode</i>	25
<i>Les gastéropodes et l'étude de la plasticité neuronale</i>	26
<i>Les mécanismes de l'apprentissage chez la drosophile</i>	29
<i>Le comportement prédateur de la seiche</i>	30
<i>Les différentes formes de mémoire du crabe Chasmagnathus</i>	31
Intérêt de l'abeille dans l'étude de la mémoire	32
La diversité des apprentissages chez l'abeille en contention	34
<i>Le réflexe d'extension du proboscis</i>	34
<i>Le conditionnement olfactif de l'extension du proboscis</i>	35
<i>Autres apprentissages associatifs utilisables en laboratoire</i>	37
<i>Apprentissages non associatifs utilisés au laboratoire</i>	39
<i>Les différentes phases de la mémoire chez l'abeille : plasticité comportementale</i>	40
<i>Les facteurs qui modulent la mémoire</i>	42
Neuroanatomie fonctionnelle de l'apprentissage chez l'abeille	44
<i>Le ganglion sous-œsophagien</i>	45
<i>Le deutocérébron</i>	47

<i>Le protocérébron</i>	50
La plasticité dans les neurones	55
<i>Rôle de l'acétylcholine dans la mise en place de la plasticité neuronale</i>	55
<i>Les effecteurs de l'acétylcholine</i>	60
<i>Le rôle modulateur de l'octopamine et des amines biogènes</i>	60
<i>Synthèse de ces données et questions actuelles</i>	62
Objectifs de ce travail	64
MATÉRIEL ET MÉTHODES 67	
Les animaux	68
<i>Prélèvement</i>	68
<i>Fixation</i>	68
Les drogues	69
<i>Opération et injection</i>	69
<i>Produits utilisés</i>	69
Protocole des expériences	70
<i>Nécessité d'expériences contrôles préliminaires</i>	70
<i>Mesure de la sensibilité au sucre</i>	72
<i>Enregistrement des mouvements d'antennes</i>	73
<i>Apprentissage mécanosensoriel</i>	74
Traitement des données	77
<i>Mouvements d'antennes</i>	77
<i>Sensibilité au sucre</i>	77
<i>Apprentissages mécanosensoriel</i>	78
RÉSULTATS..... 81	
1) EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES 82	82
1.1) Effet des drogues sur les mouvements d'antennes	82
1.2) Effet des drogues sur la sensibilité au sucre	83
1.2.1. <i>Effet du MLA</i>	84
1.2.2. <i>Effet de la DHE</i>	85
1.2.3. <i>Effet de l'α-bungarotoxine</i>	86
1.2.4. <i>Effet de la mécamylamine</i>	87
1.2.5 <i>Bilan</i>	88

2) LE CONDITIONNEMENT MÉCANOSENSORIEL.....	89
2.1) Étude de différents protocoles d'apprentissage mécanosensoriel	89
2.1.1. <i>Rappels à 20 minutes, 3 heures et 24 heures</i>	89
2.1.2. <i>Rappel à 3 jours</i>	90
2.2) Recherche d'un éventuel effet Kamin	91
3) EFFET DES DROGUES SUR LE RAPPEL.....	93
3.1) Apprentissage mécanosensoriel en un seul essai	93
3.1.1. <i>Effet de la mécamylamine et de la bungarotoxine</i>	93
3.1.2. <i>Effet du MLA et de la DHE</i>	94
3.1.3. <i>Effet du L-NAME</i>	94
3.2) Apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais	95
3.2.1. <i>Effet de la mécamylamine et de l'α-bungarotoxine</i>	96
3.2.2. <i>Effet du MLA et de la DHE</i>	97
3.2.3. <i>Effet du L-NAME</i>	98
3.3) Évaluation de la durée d'effet de la mécamylamine	99
4) EFFET DES DROGUES SUR L'APPRENTISSAGE.....	102
4.1) Apprentissage mécanosensoriel en un seul essai	102
4.1.1. <i>Effet de la mécamylamine et de l'α-bungarotoxine sur l'acquisition</i>	102
4.1.2. <i>Effet de la mécamylamine et de l'α-bungarotoxine sur la consolidation</i>	103
4.1.3. <i>Effet du MLA et de la DHE</i>	104
4.1.4. <i>Effet du L-NAME</i>	104
4.2) Apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais	105
4.2.1. <i>Effet de la mécamylamine et de l'α-bungarotoxine</i>	105
4.2.2. <i>Effet d'une injection d'α-bungarotoxine après l'apprentissage</i>	107
4.2.3. <i>Effet du MLA et de la DHE</i>	107
4.2.4. <i>Effet d'une injection de MLA après l'apprentissage</i>	109
4.2.5. <i>Effet du L-NAME</i>	109
5) BILAN DES RÉSULTATS	111
DISCUSSION	113
L'apprentissage mécanosensoriel	114
La spécificité des effets des drogues sur la mémoire	114

<i>Effets des drogues sur la sensibilité au sucre</i>	114
<i>Effets sur d'autres paramètres comportementaux</i>	115
<i>Les cas de l'α-bungarotoxine et de la DHE</i>	116
Rôle des récepteurs nicotiniques dans la mémoire de l'abeille	116
<i>Une dissociation pharmacologique</i>	116
<i>Existence de plusieurs types de récepteurs nicotiniques</i>	118
<i>Lien entre récepteurs nicotiniques et NO-synthase</i>	118
<i>Les différences entre récepteurs</i>	119
<i>Proposition et discussion d'un modèle explicatif</i>	120
<i>La cohérence avec l'électrophysiologie</i>	122
Perspectives	124
<i>Neuroanatomie fonctionnelle</i>	124
<i>Aspects cellulaires et moléculaires</i>	126
<i>L'apprentissage mécanosensoriel : une voie à explorer</i>	128
<i>La nature de la trace mnésique</i>	130
BIBLIOGRAPHIE	133
ANNEXES	163
ANNEXE 1 : PUBLICATIONS.....	164
ANNEXE 2 : CV	198
ENGLISH SUMMARY	203

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CA10s	Nombre de contacts antennaires pendant 10 s
DHE	Dihydroxy- β - ϵ - α -amino-3-hydroxybutanoate
D-NAME	N ω -nitro-D-arginine-méthyl-ester
IM	Indice de modulation
L-NAME	N ω -nitro-L-arginine-méthyl-ester
MLA	Méthyllycaconitine
MLT	Mémoire à long terme
MMT	Mémoire à moyen terme
NO	Monoxyde d'azote
REP	Réflexe d'extension du proboscis
GSO	Ganglion sous-œsophagien

INTRODUCTION

De la faculté de connaître ...

Aucun milieu n'étant complètement isolé et stable, tous les êtres vivants ont besoin d'informations pour réagir aux changements de leur environnement. Pour les animaux, l'exploitation de ces informations prend entre autres la forme d'une modification adaptative de leur comportement. On appelle **cognition** l'ensemble des opérations effectuées sur des informations (Shettleworth, 2001) ; cette définition peut s'appliquer à l'ensemble des systèmes vivants ou artificiels (ordinateur par exemple). Chez les animaux, les opérations cognitives sont sous-tendues par le système nerveux, y compris les mécanismes essentiels que sont l'acquisition et le stockage d'informations. La pleine compréhension de ces processus implique de ce fait l'étude de la façon dont le système nerveux peut enregistrer et conserver des informations.

On appelle **mémoire** la conservation de l'information, cette conservation se faisant sous la forme de traces mnésiques. L'étude de la mémoire peut se faire selon deux axes. En suivant le premier de ces axes, on cherche à comprendre quelles sont les informations apprises et utilisées par l'animal ; on s'intéresse donc à son comportement, car il constitue la seule indication des informations connues de l'animal et des opérations que celui-ci effectue sur ces informations. Le deuxième axe est l'étude du système nerveux, car celui-ci est le support de la cognition animale et donc de la trace physique de l'information, l'engramme (Thompson, 2005). En suivant cet axe d'étude, on cherche à comprendre les modifications du système nerveux générées par l'acquisition ou le stockage d'informations. Cependant, le fait que deux axes d'études puissent être distingués ne dispense pas de chercher à avoir une vision globale et synthétique du fonctionnement de la mémoire.

En particulier, quel que soit l'axe d'étude considéré, l'acquisition d'informations lors de la formation de la mémoire implique des modifications : modifications du comportement de l'animal et modification de l'état de son cerveau. La notion de changement est un concept unificateur dans l'étude de la mémoire ; le terme générique employé pour désigner de tels changements est **plasticité**. Les deux axes d'études qui viennent d'être évoqués (étude comportementale de la nature de l'information mémorisée et étude neurobiologique du support de la mémoire) peuvent donc se ramener à l'étude de la plasticité, plasticité du comportement et plasticité du système nerveux. Lorsqu'on s'intéresse à ce dernier, la plasticité peut être détectée à différentes échelles d'observation, depuis les cascades moléculaires au sein de la cellule jusqu'à des régions entières du système nerveux. Ce concept général de plasticité sous-tend donc l'étude de la mémoire à

tous les niveaux. **L'objet de ce travail est d'étudier les bases neurobiologiques de la plasticité qui sous-tend l'adaptation comportementale.**

L'étude de la mémoire est réalisée de façon optimale si l'on choisit de travailler avec des modèles d'études appropriés, c'est-à-dire chez des espèces qui permettent d'aborder facilement la plasticité mnésique à l'un des niveaux auxquels elle se manifeste (le comportement ou le système nerveux). Un modèle idéal autoriserait l'étude de la plasticité à tous les niveaux, permettant entre autres de chercher à associer chez un animal les facultés mnésiques requises par leur mode de vie à des spécificités neurobiologiques (Healy et al., 2005).

De nombreux travaux sur l'étude de la mémoire ont été réalisés sur des **vertébrés** (en général des mammifères, rongeurs ou primates). Ils ne seront pas détaillés ici, des revues historiques très complètes ayant été publiées par Gould (2004) pour l'approche comportementale et par Milner et al. (1998), Squire et Kandel (2002) ou Fanselow et Poulos (2005) pour l'approche neurobiologique. En dehors de ces revues consacrées en grande partie aux mammifères, Bshary et al. (2002) ont détaillé les facultés cognitives des poissons, Clayton et ses collègues (Griffiths et al., 1999 ; Clayton et al., 2003) celles des geais tandis que Rose (2000) a traité en détail des bases neurobiologiques de la mémoire chez le poussin.

Les processus moléculaires et cellulaires qui supportent la plasticité du système nerveux sont très conservés d'un phylum à l'autre (Milner et al., 1998), et plusieurs travaux importants voire décisifs ont été réalisés sur des **invertébrés** (Krasne et Glanzman, 1995 ; Milner et al., 1998 ; Alberini, 1999 ; Burrell et Sahley, 2001 ; Brembs, 2003 ; Greenspan et van Swinderen, 2004). Aussi, certains résultats importants obtenus avec ces animaux vont être détaillés par la suite.

Quelques concepts importants dans l'étude de la mémoire

L'événement qui déclenche les processus de plasticité comportementale ou neurobiologique est l'acquisition d'information ; on appelle **apprentissage** le fait d'acquérir des informations (acquisition) et de les conserver. On peut détecter cette acquisition d'informations lorsqu'elle se manifeste par une modification du comportement de l'animal. Tout apprentissage appartient à l'une des deux catégories suivantes : apprentissage associatif et apprentissage non associatif. Au cours d'un **apprentissage non associatif**, on observe une modification de la réaction de l'animal consécutive à une stimulation donnée. Dans un **apprentissage associatif**, l'animal apprend soit à associer deux stimuli ou plus (ou un stimulus et une réponse comportementale), soit à associer son comportement aux

conséquences de celui-ci. La première forme d'apprentissage associatif correspond au conditionnement pavlovien, également appelé conditionnement classique (Rescorla, 1988a, 1988b ; Domjan, 2005) ; tandis que l'autre situation correspond au conditionnement opérant (ou instrumental ; Skinner, 1935 ; Dragoi, 1997).

Les différentes formes de plasticité induites par l'apprentissage ont la propriété remarquable de ne pas aboutir immédiatement à une trace mnésique. Ainsi, peu de temps après un apprentissage, la performance des animaux est momentanément assez faible, parfois inférieure au niveau atteint à la fin de l'entraînement ; par la suite, la performance des animaux remonte pour atteindre ou dépasser celle observée à la fin de l'apprentissage. La trace mnésique est donc inaccessible pendant un certain temps après l'apprentissage. On appelle **effet Kamin** ce phénomène (Kamin, 1957). Par ailleurs, il est bien connu que divers traitements amnésiants (chocs électriques, anoxie, refroidissement, inhibition de la synthèse de protéines ...) empêchent l'établissement de la trace mnésique dans le cerveau à condition d'être appliqués dans les instants qui suivent l'apprentissage.

Ces observations indiquent que la trace mnésique n'est pas immédiatement formée de façon stable dans le cerveau. Elles sont interprétées en proposant l'existence d'un phénomène appelé **consolidation**, qui désigne le passage de la trace mnésique d'une forme labile à un état plus pérenne.

Par la suite, les traces mnésiques formées peuvent être exploitées, et on nomme **rappel** ce processus de restitution des traces mnésiques, c'est-à-dire de récupération de l'information par l'animal. Il est important de remarquer que l'on ne peut pas mesurer directement la mémoire elle-même lorsqu'on teste le rappel : on ne mesure que la performance des animaux, c'est-à-dire leur comportement. Ce point est d'ailleurs explicite dans la définition de l'apprentissage précédemment donnée : on ne peut le quantifier que s'il se traduit par une variation du comportement. Par contre, toute variation du comportement n'implique pas nécessairement un processus d'apprentissage (Cahill et al., 2001 ; Thorpe et al., 2004).

Plasticité du comportement chez quelques invertébrés

Dans cette section, la plasticité sera étudiée au niveau comportemental. On cherchera à mettre en évidence la façon dont l'acquisition d'informations se traduit par des modifications du comportement.

L'orientation spatiale chez l'araignée

Les facultés mnésiques des **araignées** n'ont pas été très étudiées, néanmoins certains de ces animaux sont capables de performances remarquables. Ainsi, les araignées sauteuses du genre *Portia* chassent à vue d'autres araignées et peuvent facilement apprendre à parcourir un labyrinthe pour se diriger vers un appât (une proie morte). Si on leur laisse le choix entre deux trajets dont un seul mène à une proie, elles choisiront le bon itinéraire si elles ont l'opportunité d'observer au préalable les différentes voies d'accès (Tarsitano et Jackson, 1997 ; Tarsitano et Andrew, 1999). Au cours de cette observation initiale, l'araignée peut voir l'appât et l'ensemble des parcours car elle est située sur un cylindre qui surplombe l'ensemble du dispositif. Par contre, lorsque l'araignée descend du cylindre et s'engage dans le labyrinthe, elle n'a plus une vision globale de celui-ci et ne voit plus l'appât. Dans ces conditions, elle choisit généralement les voies qui mènent à sa nourriture et ignore les autres, même si le bon itinéraire lui impose de faire parfois des détours qui ne partent pas en direction de la cible. L'animal doit donc retenir le bon itinéraire sans pouvoir guider son trajet par l'observation de la direction de son objectif.

Ceci indique non seulement de bonnes capacités de navigation spatiale, mais également la faculté de retenir un objectif et le choix d'un itinéraire pendant au moins quelques instants. La phase d'observation initiale permet à l'araignée de rassembler toutes ces informations ; par la suite, sa performance indique qu'elle est capable de s'en souvenir et de les exploiter. L'exemple de l'araignée chasseuse est donc représentatif de la façon dont les animaux peuvent exploiter des informations dans leur comportement.

La résolution de problèmes chez la pieuvre

La **pieuvre** *Octopus vulgaris* est capable de résoudre un problème consistant à ouvrir un bocal de verre à l'aide de ses tentacules pour y récupérer une proie (Fiorito et al., 1998). Dans cette expérience, on présente à l'animal une de ses proies habituelles (un crabe). Ce bocal est fermé par un bouchon. Après avoir tenté sans succès d'attraper le crabe, la pieuvre manipule un moment le bocal et finit par retirer le bouchon, ce qui lui permet de capturer sa proie. Si l'expérience est répétée à plusieurs reprises la pieuvre met de moins en moins de temps pour ouvrir le bocal et saisir le crabe, ce qui indique qu'elle apprend à améliorer sa performance au fil des essais.

Ce type d'apprentissage sophistiqué est donc possible chez d'autres animaux que les primates et indique des facultés très développées de traitement de l'information. En l'occurrence, le fait que la pieuvre soit capable de résoudre le problème et également

d'améliorer sa performance au cours du temps est révélateur de la plasticité comportementale dont elle fait preuve.

La navigation chez les insectes

Un certain nombre d'espèces d'insectes hyménoptères (fourmis, abeilles, bourdons) ont une excellente **mémoire spatiale**, et leurs performances ne diffèrent guère de celles des oiseaux ou des mammifères en dépit de leur système nerveux bien plus simple (Collett et Collett, 2002). Ces animaux sont capables de retrouver leur chemin entre leur nid et une source de nourriture, et d'apprendre des itinéraires en se fiant aux points de repère du milieu. Il s'agit là d'un phénomène complexe au cours duquel l'animal intègre différentes informations lui permettant de retrouver l'itinéraire à suivre.

Par exemple, pour trouver les fleurs qu'elle butine, l'abeille *Apis mellifera* doit quitter sa ruche et voler à leur recherche (parfois sur plusieurs kilomètres) avant de retourner à la ruche. Le déplacement sur des distances aussi importantes est rendu possible par des facultés très développées d'**orientation**. Celles-ci reposent sur deux systèmes de navigation (Giurfa et Capaldi, 1999 ; Menzel et al., 2000) : un système égocentrique où l'animal exploite un « vecteur d'intégration » qui indique à tout moment la direction et l'éloignement de la ruche, et un système allocentrique où les différents points de repère du milieu (entre autres, le soleil) sont appris et utilisés. Collett et Collett (2002) ont suggéré que les points de repère des insectes leur indiquent quelles actions entreprendre plutôt que l'endroit où ils se trouvent ; cependant, Menzel et al. (2005) ont indiqué que des abeilles déplacées alors qu'elles se rendaient à une source de nourriture ou à la ruche sont capables de retrouver leur chemin.

L'importante plasticité du comportement d'orientation des abeilles (ou d'autres insectes) provient de l'utilisation de différentes informations (kinesthésiques ou visuelles) et indique que loin d'être limités à quelques stimuli, les invertébrés sont capables d'intégrer de nombreuses données et d'en tenir compte dans leur comportement.

Les performances de l'abeille dans la nature

Dans la nature, les abeilles ouvrières d'une ruche consacrent une part significative de leur existence à la recherche de nourriture (nectar et pollen) par le butinage des fleurs (Winston, 1987). Aussi il n'est pas surprenant de constater qu'elles sont capables d'apprendre à **associer ces ressources alimentaires aux caractéristiques des fleurs** telles que la forme, la couleur, la texture des pétales ou l'odeur et qu'elles sont prédisposées à réaliser une telle association. Cet apprentissage se manifeste chez les butineuses par le choix d'une espèce de fleurs spécifiques, et l'exploitation de celle-ci de préférence à d'autres sources. Ce

comportement des butineuses est appelé constance florale (Menzel et al., 1974 ; Menzel, 1985 ; Chittka et al., 1999).

Plusieurs protocoles de conditionnement ont mis en évidence les facultés de l'abeille à apprendre des tâches aussi variées que celles que peuvent apprendre les vertébrés (Bitterman, 1988, 1996). Dans cette optique, l'étude des performances **d'apprentissages visuels** chez les abeilles a montré que celles-ci sont susceptibles d'extraire des informations communes à plusieurs stimuli différents. Ces insectes sont ainsi capables d'apprendre à choisir entre deux stimuli sur la seule base de leur orientation (Stach et al., 2004) ou de leur symétrie (Giurfa et al., 1996). L'abeille peut donc apprendre des caractéristiques secondaires (car issues de comparaisons entre stimuli) telles que l'orientation et la symétrie et de les généraliser d'un stimulus à l'autre. De même, si elles aperçoivent un stimulus donné à l'entrée d'un labyrinthe en Y, elles peuvent être entraînées à choisir ensuite soit un stimulus identique au premier, soit un stimulus différent, et ceci quel que soit le stimulus (Giurfa et al., 2001).

Ces résultats indiquent que l'abeille est non seulement capable de retenir des informations très diversifiées, mais aussi de les comparer entre elles. Le comportement de cet insecte donne accès à des formes de plasticités comportementales complexes.

Plasticité du système nerveux chez quelques invertébrés

L'objectif de cette section est de mettre en évidence la plasticité neurobiologique, c'est à dire les modifications induites dans le système nerveux lors de l'acquisition d'informations. On recherche la corrélation entre la plasticité comportementale et l'activité du système nerveux qui la sous-tend. Fréquemment, des protocoles d'apprentissage différents mènent à des formes de mémoire différentes, que l'on peut également distinguer par les événements neurobiologiques sous jacents.

Un réseau nerveux très réduit : plasticité des 302 neurones du nématode

Le **nématode** *Caenorhabditis elegans* est surtout connu pour son développement remarquable : au cours de celui-ci, la destinée de chacune de ses 959 cellules (dont 302 neurones) est déterminée génétiquement de façon identique chez tous les membres de l'espèce. Incidemment, un tel déterminisme a longtemps suggéré que ses 302 neurones étaient connectés d'une façon rigide ne laissant que peu de place aux phénomènes de plasticité. Dans ces conditions, la rigidité de ce système ferait de ces animaux des êtres dépourvus de facultés d'apprentissage.

Cette vue est désormais caduque, et on sait que le nématode est capable d'associer des stimuli chimiques ou thermiques à la présence ou à l'absence de nourriture (Rankin, 2004). Quoiqu'il s'agisse d'apprentissages simples, cela indique malgré tout que même un système nerveux extrêmement réduit peut se prêter à la plasticité. Il est donc tout à fait pertinent de rechercher les bases neurobiologiques de la mémoire chez des modèles invertébrés.

Les gastéropodes et l'étude de la plasticité neuronale

La plasticité neurobiologique peut être étudiée entre autres au niveau des réseaux de neurones eux-mêmes, et certains gastéropodes aquatiques tels que la limnée ou l'aplysie sont à cette fin des modèles précieux.

La **limnée** (l'escargot d'eau *Lymnaea stagnalis*), peut acquérir différentes formes de conditionnements (Kawai et al., 2004). Voici l'exemple d'un conditionnement opérant aversif décrit par Lukowiak et al. (2003). Au cours de ce protocole, la limnée est placée dans un bassin dont l'eau est appauvrie en oxygène par l'envoi d'azote. Dans ces conditions, l'animal complète la respiration cutanée qu'il utilise d'ordinaire par une respiration aérienne pulmonaire. Pour respirer de cette façon, la limnée remonte à la surface et ouvre son pneumostome (orifice pulmonaire). Si on touche celui-ci à ce moment il se referme, si bien que l'animal apprend à ne plus se servir de la respiration aérienne dans des conditions anoxiques et cesse de remonter à la surface (il peut rester quelques temps dans l'eau appauvrie en oxygène sans dommages). Si les sessions d'entraînement sont séparées de 30 minutes, la limnée ne retient cette tâche que pendant quelques heures, tandis que si elles sont séparées de 60 minutes ou plus, alors la trace mnésique peut durer un mois : on parle alors de mémoire à long terme. Selon la façon dont se déroule l'apprentissage, des types différents de mémoires sont donc formés.

Un groupe de trois neurones impliqués dans la respiration pulmonée est nécessaire dans la formation de la mémoire à long terme (Lukowiak et al., 2003) ; en particulier, le soma d'un neurone nommé RPeD1 est nécessaire à son acquisition et à sa consolidation. Par contre, une fois la trace mnésique formée, les neurites seuls suffisent à la supporter (sans que l'on sache comment) puisque l'ablation du soma après la consolidation n'empêche pas les animaux d'utiliser leur mémoire à long terme (Lukowiak et al., 2003).

Le cas de la limnée est représentatif des possibilités offertes par les gastéropodes : en effet, on peut chez cet animal réduire la plasticité à l'activité de neurones précis, ce qui est crucial pour comprendre le fonctionnement de la mémoire à l'échelle cellulaire. De plus, les substrats neuronaux d'autres formes de mémoires peuvent être étudiés chez cet animal (Benjamin et al., 2000).

C'est également le cas de l'**aplysie** (la limace de mer *Aplysia californica*), chez qui on connaît assez bien les bases neurobiologiques des trois grands types d'apprentissage : l'apprentissage non associatif avec l'habituation (Cohen et al., 1997 ; Frost et al., 1997), le conditionnement pavlovien (Carew et al., 1981) et le conditionnement opérant (Brembs et al., 2002). Tout comme pour la limnée, c'est grâce à la relative simplicité et à la taille réduite du système nerveux de ce mollusque (dont plusieurs gros neurones sont identifiables d'un individu à l'autre) qu'on a pu décrire en détail la plasticité cellulaire liée à l'apprentissage.

Le **conditionnement opérant** décrit par Brembs et al. (2002) illustre bien comment on peut tirer parti de la relative simplicité du système nerveux de l'aplysie. En effet, ce mollusque effectue régulièrement des morsures tout en rampant sur son substrat : ces morsures consistent en l'ouverture de la bouche et à un mouvement d'ingestion de la radula (langue râpeuse des gastéropodes). Un neurone particulier, le neurone En2, est associé à la prise de nourriture chez l'aplysie. Si, pendant 10 minutes, on stimule ce neurone (à l'aide d'électrodes) lors de chaque morsure spontanée, alors la fréquence des morsures est augmentée pendant 24 heures. L'animal apprend donc à associer une récompense virtuelle (la stimulation du neurone En2 normalement associée à la nourriture) à son comportement de morsure ; ce neurone est donc un support de la représentation des récompenses alimentaires chez l'aplysie. De plus, les patterns moteurs buccaux sont contrôlés par un groupe de neurones associés au tube digestif. Parmi ces neurones, le neurone B51 joue un rôle essentiel puisque sa stimulation déclenche la morsure tandis que son inhibition empêche l'apparition de celle-ci. L'activité de ce neurone augmente lors du conditionnement opérant de la morsure. Le neurone B51 reçoit des stimulations dopaminergiques de la part du neurone En2 ; si on stimule le B51 en culture avec de la dopamine (reproduisant ainsi *in vitro* l'effet du neurone En2), son activité est durablement augmentée, comme lors du conditionnement.

L'exemple qui vient d'être présenté caractérise bien les apports de l'aplysie dans l'étude des bases neuronales de la mémoire : le conditionnement opérant de la morsure peut être réduit à un système ne comportant que quelques neurones. Même s'il est clair que plusieurs autres neurones sont en fait impliqués, l'intérêt de ce modèle est de mettre en évidence que la trace mnésique se met en place grâce à des modifications de certains neurones. **La plasticité comportementale a donc pour corrélat la plasticité de l'activité neuronale.** Plusieurs autres protocoles ont exploité les facilités qu'offre l'aplysie dans le domaine de la plasticité synaptique. Par exemple, le réflexe de retrait des branchies est normalement déclenché si on touche le manteau de l'aplysie ; un contact régulier sur le manteau entraîne la disparition de ce réflexe, ce qui est un apprentissage non associatif

nommé **habituatio**n. Cette habituatio

Enfin, d'autres travaux très importants ont été accomplis par Kandel et ses collaborateurs ; ces travaux mettent eux aussi en évidence des modifications du fonctionnement des synapses chez l'aplysie. Ces résultats ont été obtenus lors du **conditionnement pavlovien** de retrait des branchies. Si on touche légèrement le siphon (canal amenant l'eau aux branchies) d'une aplysie, celle-ci rétracte peu ses branchies ; au cours du conditionnement, on touche le siphon puis on envoie un choc électrique dans la queue de l'animal ce qui provoque la rétraction des branchies et du siphon. L'aplysie associe alors les deux stimulations et par la suite, toucher le siphon suffit à déclencher le retrait des branchies (Carew et al., 1981). Le réseau nerveux supportant cet apprentissage a été décrit, et bien qu'il comporte plusieurs centaines de neurones, un modèle n'impliquant que trois d'entre eux a été proposé (Glanzman, 1995 ; Lechner et Byrne, 1998 ; Roberts et Glanzman, 2003). Le neurone sensoriel qui détecte le contact sur le siphon est connecté par une synapse au neurone moteur qui rétracte les branchies et le siphon. Un troisième neurone, provenant de la queue, détecte le choc électrique. On a longtemps pensé que ce neurone détectant le choc électrique ne se projetait que sur le neurone sensoriel, et donc que la plasticité n'avait lieu que dans ce neurone. En réalité, on sait maintenant que le neurone apportant l'information liée au choc électrique se projette également sur le neurone post-synaptique.

Dans ce protocole, l'apprentissage se traduit par une facilitation de la transmission entre le neurone sensoriel du siphon et le neurone moteur de la rétraction. Cette facilitation est induite par les activations simultanées du neurone sensoriel du siphon et du neurone sensoriel de la queue, mais aussi par des phénomènes de plasticité post-synaptique. La plasticité synaptique mise en œuvre lors du conditionnement pavlovien chez l'aplysie repose donc sur une modification du neurone pré-synaptique -le neurone sensoriel du siphon- et du neurone postsynaptique -le neurone moteur de la rétraction (Glanzman, 1995 ; Lechner et Byrne, 1998 ; Roberts et Glanzman, 2003). En d'autres termes, les deux neurones impliqués dans la synapse (le neurone sensoriel du siphon et le neurone moteur de rétraction) sont tous les deux modifiés lors de l'apprentissage : cette plasticité synaptique a pour conséquence de faciliter la transmission synaptique. De ce fait, lorsque le neurone sensible au contact sur le siphon est activé, il active beaucoup plus le neurone moteur commandant le retrait de branchies qu'il ne le faisait avant l'apprentissage, déclenchant la rétraction des branchies et du siphon -ce qui ne

se produisait pas avant l'apprentissage. Ce phénomène de plasticité synaptique qui sous-tend directement la trace mnésique constitue un exemple de **potentialisation à long terme** de la transmission synaptique entre le neurone sensoriel du siphon et le neurone moteur (Glanzman, 1995 ; Lechner et Byrne, 1998 ; Squire et Kandel, 2002 ; Roberts et Glanzman, 2003).

L'AMP cyclique joue un rôle central dans ces phénomènes. Entre autres actions, l'AMP cyclique active un facteur de transcription nommé CREB, qui est à l'origine de la plasticité synaptique à long terme (Glanzman, 1995 ; Squire et Kandel, 2002 ; Roberts et Glanzman, 2003). La potentialisation à long terme et l'activation du facteur CREB sont également impliquées dans la mémoire chez les vertébrés (Milner et al., 1998 ; Squire et Kandel, 2002) et la drosophile (voir ci-dessous).

La limace de mer est donc devenue au même titre que les mammifères un modèle essentiel dans la **compréhension de la plasticité synaptique** et du rôle des interactions entre les neurones lors de l'apprentissage et du rappel. Les travaux réalisés sur l'aplysie dans ce domaine sont représentatifs de l'importance des invertébrés dans l'apprentissage et la mémoire.

Les mécanismes de l'apprentissage chez la drosophile

Tout comme l'aplysie, la **drosophile** a permis d'étudier de façon détaillée les mécanismes cellulaires de l'apprentissage et de la mémoire. En effet, grâce aux possibilités offertes par cet insecte en génétique, de nombreux gènes et protéines mis en jeu dans l'apprentissage ont pu être mis en évidence.

Ces résultats ont pu être obtenus entre autres à l'aide d'un apprentissage olfactif durant lequel les animaux associent un choc électrique à une odeur (Tully et al., 1994). Au cours de ce conditionnement, un groupe de drosophiles est placé dans un tube. Deux odeurs différentes (notées A et B) sont successivement envoyées dans le tube ; l'une de ces odeurs (A) est associée à un choc électrique, stimulus aversif. Par la suite, on place ces mouches dans un labyrinthe en Y où elles ont le choix entre deux branches, chaque branche ayant l'une des odeurs précédentes (A et B). Les mouches, qui ont formé une association entre le choc électrique et l'odeur A, évitent celle-ci et se retrouvent donc toutes dans la branche comportant l'odeur B, qui n'a jamais été associée à un choc électrique.

Lors de cet apprentissage, la plasticité mnésique dépend de la façon dont l'entraînement se fait. En effet, lorsque l'apprentissage s'effectue en un seul essai ou en plusieurs essais massés (sans période de repos entre chaque essai), la mémoire qui apparaît est appelée mémoire résistante à l'anesthésie ; cette forme de mémoire persiste jusqu'à 24 heures

après l'apprentissage avant de s'affaiblir. Par contre, lorsque l'apprentissage est réalisé en plusieurs essais distribués (c'est-à-dire en ménageant une pause entre chaque essai), les drosophiles forment initialement une mémoire à moyen terme, par la suite remplacée par une mémoire à long terme, qui persiste pendant une longue durée (Tully et al., 1994 ; DeZazzo et Tully, 1995 ; Dubnau et al., 2003 ; Isabel et al., 2004).

Ces différentes formes de mémoire sont sous-tendues par des **mécanismes distincts** (Tully et al., 1994 ; DeZazzo et Tully, 1995 ; Dubnau et al., 2003 ; Greenspan et van Swinderen, 2004 ; Isabel et al., 2004). La mémoire résistante à l'anesthésie (formée lors de l'apprentissage massé ou en un seul essai) est bloquée chez les porteurs d'une mutation du gène *radish*, qui code pour une phospholipase (Chiang et al., 2004). Par contre, la mémoire à moyen terme est bloquée chez les drosophiles portant une mutation au gène *amnesiac*, qui code pour un neuropeptide (Feany et Quinn, 1995) ; cette mémoire est finalement remplacée par une mémoire à long terme. La mémoire à long terme (mais pas la mémoire résistante à l'anesthésie) repose en outre sur la synthèse de protéines (Tully et al., 1994) et sur une voie cellulaire basée sur l'AMP cyclique (et affectée entre autres par des mutations des gènes *dunce* ou *rutabaga* ; pour revue, voir Dubnau et al., 2003) qui aboutit à l'activation du facteur de transcription CREB (Perazzona, 2004), dont on a vu ci-dessus qu'il est impliqué dans la mémoire chez l'aplysie. On trouve donc chez la drosophile des formes de mémoires dépendantes de la nature de l'apprentissage (un ou plusieurs essais) et sous-tendues par des cascades de molécules distinctes.

Le comportement prédateur de la seiche

Les céphalopodes disposent d'un cerveau bien développé et font preuve de facultés cognitives sophistiquées, comme on l'a vu précédemment chez la pieuvre. L'intérêt des céphalopodes pour les neurosciences est clairement mis en évidence par la possibilité d'utiliser des techniques de pharmacologie comportementale (Agnisola et al., 1996) et par la diversité des études qu'il est possible d'effectuer chez ces animaux (Williamson et Chrachri, 2004).

Le comportement prédateur de la **seiche** *Sepia officinalis* a été décrit de façon détaillée et comprend plusieurs phases qui mettent en jeu différentes zones de leur cerveau. Les voies nicotiques de la seiche ont été décrites par Bellanger et al. (1998). L'injection d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs nicotiques dans des zones précises du cerveau a permis de montrer que l'acétylcholine est impliquée dans la plasticité du comportement prédateur (Halm et al., 2002). Les performances mnésiques des seiches âgées sont assez mauvaises (Bellanger et al., 1997) et l'activité de choline-acétyltransférase (l'enzyme qui synthétise l'acétylcholine)

diminue avec l'âge, ce qui suggère que ces mauvaises performances s'expliqueraient par une baisse de la production d'acétylcholine.

La seiche est capable d'apprendre à inhiber son comportement prédateur : lorsqu'on lui présente une crevette enfermée dans un tube de verre, elle éjecte ses tentacules pour la capturer, mais ceux-ci viennent se cogner sur le tube ; dans ces conditions, elle cesse bientôt d'envoyer ses tentacules. Bellanger et al. (2003) ont mis en évidence le rôle des enzymes liées à la synthèse et la dégradation de l'acétylcholine dans certaines zones du cerveau au cours du rappel de cet apprentissage. Les enzymes et les zones impliquées ne sont pas les mêmes selon que le rappel est pratiqué 1 heure après un apprentissage en un essai ou 24 heures après un apprentissage en plusieurs essais. Le rappel induit donc des effets différents dans des zones du cerveau différentes selon le moment où il est effectué et selon le type d'apprentissage. En d'autres termes, selon la façon dont l'information est apprise (un ou plusieurs essais) et le moment où elle est récupérée (1 heure ou 24 heures après l'apprentissage), les zones du système nerveux mises en jeu ne seront pas les mêmes. Différentes situations mènent donc à différentes formes de **plasticité neurobiologique**.

*Les différentes formes de mémoire du crabe *Chasmagnathus**

Chez les crustacés, le **crabe** *Chasmagnathus* a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Cet animal essaie de s'enfuir dès que passe au dessus de lui une ombre ; ce comportement de fuite s'explique dans la nature par la prédation dont il fait l'objet de la part des oiseaux. Au laboratoire, cette fuite est quantifiable par les vibrations que génère le crabe en se déplaçant dans la cuvette à l'intérieur de laquelle il se trouve lors de l'expérience ; le stimulus qui génère ce comportement est le passage au dessus du crabe d'une forme rectangulaire sombre. Deux protocoles ont été développés à partir de ce comportement.

Au cours du premier protocole, la présentation répétitive du stimulus visuel entraîne une disparition du réflexe de fuite, un apprentissage non associatif appelé habituation ; le crabe a appris à ignorer le stimulus et cesse d'essayer de fuir. Dans ces conditions, les vibrations reviennent au niveau de base (c'est-à-dire qu'on enregistre seulement les mouvements normaux du crabe). Ce protocole est réalisé de façon massée (300 essais séparés de 9 s). Dans ces conditions, la mémoire ne perdure que durant 1 à 2 jours et ne dépend pas du contexte (c'est-à-dire qu'elle s'exprime quelle que soit la cuvette utilisée pour tester le rappel de la tâche).

Dans l'autre protocole, l'apprentissage se fait par contre de façon distribuée (15 essais séparés de 171 secondes), la trace mnésique est bien plus pérenne et dure au moins 5 jours (Pereyra et al., 2000). De plus, les crabes n'apprennent pas la même chose. Ils apprennent à se

plaquer au fond de la cuvette et à cesser tout mouvement (on parle alors de « freezing »), et on n'enregistre plus aucune vibration. Plus précisément, l'animal associe durablement son comportement de freezing à la cuvette dans laquelle il a été entraîné. Dans le protocole précédent le crabe apprend juste à ignorer le stimulus visuel quelle que soit la cuvette utilisée pour le test. La trace mnésique formée dépend du type d'entraînement subi : une mémoire non associative (l'habituation de la réponse de fuite) est formée lorsque l'apprentissage se fait en condition massée, tandis que la mémoire associative (freezing associé à un contexte précis) n'apparaît que lorsque l'apprentissage est distribué. Différentes formes d'entraînements provoquent donc différentes formes de plasticité.

Deux formes de mémoire peuvent se développer en fonction de la nature de l'apprentissage : soit une mémoire non associative et limitée à deux jours (suite à un apprentissage massé), soit une mémoire associative et pérenne (suite à un apprentissage distribué). L'utilisation du crabe *Chasmagnathus* a donc permis d'observer comment le même type d'informations présenté de différentes façons (massée ou distribuée) peut induire différentes formes de plasticité comportementale, non associative (habituation) ou associative (freezing lié à un contexte spécifique).

Le support neurobiologique de cette dissociation a été étudié en détail, et il a été démontré que les récepteurs cholinergiques de type muscarinique (Beron de Astrada et Maldonado, 1999), les récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Troncoso et Maldonado, 2002) et la synthèse de protéines (Pedreira et al., 1995 ; Hermitte et al., 1999) sont impliqués dans la consolidation de l'apprentissage associatif mais pas dans l'habituation simple.

Intérêt de l'abeille dans l'étude de la mémoire

Certaines espèces d'insectes ont été employées pour étudier la mémoire et l'apprentissage, et ceci depuis plusieurs décennies (Alloway, 1972). Par exemple, certaines des performances cognitives les plus complexes peuvent être étudiées chez **l'abeille ouvrière** *Apis mellifera*, comme par exemple l'extraction d'informations communes à plusieurs stimuli différents (Giurfa et al., 1996 ; Giurfa et al., 2001 ; Stach et al., 2004). Les similitudes qui existent entre les performances mnésiques de l'abeille et des vertébrés ont été soulignées par Bitterman (1988 ; 1996). Bien que ce dernier ait estimé dans ces deux articles que la petitesse de cerveau de cet insecte empêchait de réaliser des études neurophysiologiques poussées, les faits lui ont donné tort (Gauthier et al., 1999). En effet, ce modèle permet d'aborder tant la neurobiologie de la mémoire que les comportements qui en découlent, soit les deux axes d'étude de la mémoire précédemment mentionnés. L'abeille est donc précieuse pour étudier la

façon dont un système nerveux relativement simple sous-tend des capacités cognitives complexes (Menzel et Giurfa, 2001 ; Giurfa, 2003). Compte tenu de ces caractéristiques, de l'originalité de ses particularités biologiques (Winston, 1987) et de son intérêt commercial, **ce travail sur la neurobiologie de la plasticité mnésique lui a été consacré.**

Les performances mnésiques des animaux, pour être interprétées correctement, doivent être comprises dans le cadre de leur répertoire comportemental : c'est ce qu'on appelle l'approche neuroécologique (Kamil, 1998 ; Healy et al., 2005). Toutefois, étudier la neurobiologie de la mémoire chez l'abeille nécessite de travailler sur des animaux en contention dans un laboratoire, c'est-à-dire dans une situation éloignée des conditions naturelles. Plusieurs arguments permettent cependant d'affirmer que les processus mnésiques utilisés lors de ces apprentissages en laboratoire sont sinon les mêmes, du moins très proches de certains de ceux employés en vol libre. En effet, ces apprentissages sont dérivés de ceux que l'abeille effectue dans la nature. Ainsi, si on place une ruche près d'un tilleul (*Tilia sp*) en fleurs, les abeilles vont se mettre à butiner les fleurs de l'arbre ; si on capture ces abeilles et si on leur présente une odeur de tilleul en laboratoire, on constate que cette odeur provoque une extension du proboscis (voir section suivante), au même titre que pour des abeilles en contention entraînées avec un protocole de conditionnement olfactif (Gerber et al., 1996). Inversement, des abeilles conditionnées en laboratoire s'orientent un fois relâchées préférentiellement vers l'odeur qu'elles ont apprise (Sandoz et al., 2000). Lors des trophallaxies (échanges de nourriture par voie buccale entre abeilles), les ouvrières apprennent à associer l'odeur de la fleur d'où le nectar a été prélevé à une récompense sucrée, une telle association se traduisant en laboratoire par un réflexe d'extension du proboscis pour cette odeur (Gil et De Marco, 2005). Ces observations montrent que l'abeille est capable de **transposer un apprentissage effectué en laboratoire en milieu naturel, et inversement.** De même, l'apprentissage de textures examinées avec l'extrémité des antennes est employé dans la nature pour identifier les motifs des pétales et se manifeste aussi en laboratoire (Kevan et Lane, 1985 ; Kevan, 1987 ; Erber et al., 1998). Les différentes phases de la mémoire formée en laboratoire (mémoire à moyen terme et mémoire à long terme, voir ci-dessous) sont les mêmes que celles rapportées dans les apprentissages en vol libre (Erber, 1975a, 1975b ; Menzel, 1979). Il a donc été proposé que ces différentes phases correspondent aux différents délais de rétention observés dans la nature (Greggers et Menzel, 1993 ; Menzel, 1999) : la mémoire à moyen terme servirait à retenir quelles fleurs ont été butinées au cours d'un jour donné, et la mémoire à long terme servirait à retenir la position des fleurs autour de la ruche.

La diversité des apprentissages chez l'abeille en contention

Le réflexe d'extension du proboscis

La majorité des protocoles d'apprentissage utilisés chez l'abeille en contention repose sur une réponse facile à obtenir et à quantifier, le réflexe d'extension du proboscis (REP). Du fait de son importance dans l'étude des apprentissages chez l'abeille, il va maintenant être détaillé.

L'appareil buccal des abeilles est du type broyeur lécheur, c'est-à-dire qu'il comporte une paire de mandibules et une trompe formée par la réunion des maxilles et du labium ; au repos, cette trompe nommée **proboscis** est repliée dans une cavité sous la bouche (Snodgrass, 1956 ; Goodman, 2003). Le proboscis porte de nombreuses sensilles à la fois tactiles et gustatives (Whitehead et Larsen, 1976b, 1976a), qui se projettent vers des zones du système nerveux central nommées ganglion sous-œsophagien (GSO) et tritocérébron (Haupt et Barbara, article en préparation).

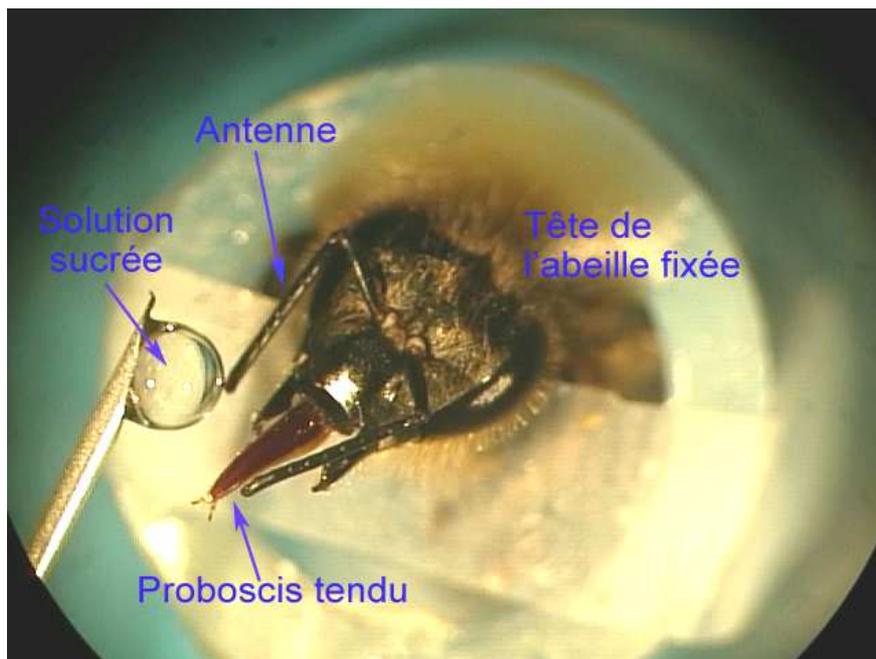


Figure 1 : le réflexe d'extension du proboscis (REP).

Si une solution sucrée entre en contact avec les antennes d'une abeille suffisamment à jeun (ou éventuellement avec les pattes antérieures ou le proboscis lui-même), elle a le réflexe de déplier et tendre son proboscis : c'est le réflexe d'extension du proboscis, ou REP, illustré *figure 1*. Le déroulement chronologique du REP provoqué par la stimulation antennaire a été décrit en détail par Rehder (1987 ; 1989), Gauthier et Richard (1992), et Haupt (2004). On

considère qu'il y a eu un REP dès lors que le proboscis dépasse une ligne virtuelle joignant l'extrémité des mandibules ouvertes. Ce mouvement du proboscis est contrôlé par un ensemble de muscles situés dans la tête et facilement identifiables, dont les muscles M17 (Snodgrass, 1956 ; Goodman, 2003). Leurs motoneurones sont situés dans le GSO. Le REP s'accompagne d'une orientation de la tête, des antennes et du proboscis vers la solution sucrée (Buckbee et Abramson, 1997) qui est aspirée par l'abeille par des mouvements rythmiques de la glosse (langue). Dans la nature, le proboscis joue un rôle important dans la nutrition de l'abeille et lui sert notamment à aspirer le nectar au fond des fleurs (Winston, 1987). Le REP peut être conditionné à différents stimuli olfactifs ou tactiles.

Le conditionnement olfactif de l'extension du proboscis

La plasticité comportementale de l'abeille en contention lors de la formation de la trace mnésique a été essentiellement étudiée à l'aide du **conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis** (ou REP). Le déroulement de ce conditionnement est illustré *figure 2* page suivante. Le REP est connu depuis longtemps et son conditionnement olfactif, initialement rapporté par Takeda (1961), a été étudié en détail (Bitterman et al., 1983 ; Menzel et Bitterman, 1983).

Le conditionnement olfactif du REP est un conditionnement pavlovien au cours duquel l'animal est placé dans un flux d'air constant. Si on envoie une odeur dans ce flux d'air, en général une abeille naïve ne réagira tout au plus qu'en accélérant les mouvements de ses antennes (Suzuki, 1975 ; Lambin et al., 2005). Quelques secondes après le début de la stimulation odorante, on touche les antennes de l'abeille avec une goutte de solution sucrée, ce qui provoque le REP ; l'animal est ensuite autorisé à boire la solution sucrée pendant quelques secondes. La présentation conjointe des deux stimuli (odeur et sucre) permet à l'abeille de les associer si bien que par la suite, le REP est déclenché par la présentation de l'odeur seule. Cette réponse indique que l'odeur a acquis une nouvelle signification et qu'elle est maintenant associée à la présence de nourriture ou au REP. Ce type de conditionnement est un apprentissage associatif pavlovien (association odeur/sucre ou odeur/REP) ; dans la terminologie de ce paradigme, le stimulus conditionné est l'odeur, le stimulus inconditionnel est la solution sucrée et la réponse conditionnée est le REP.

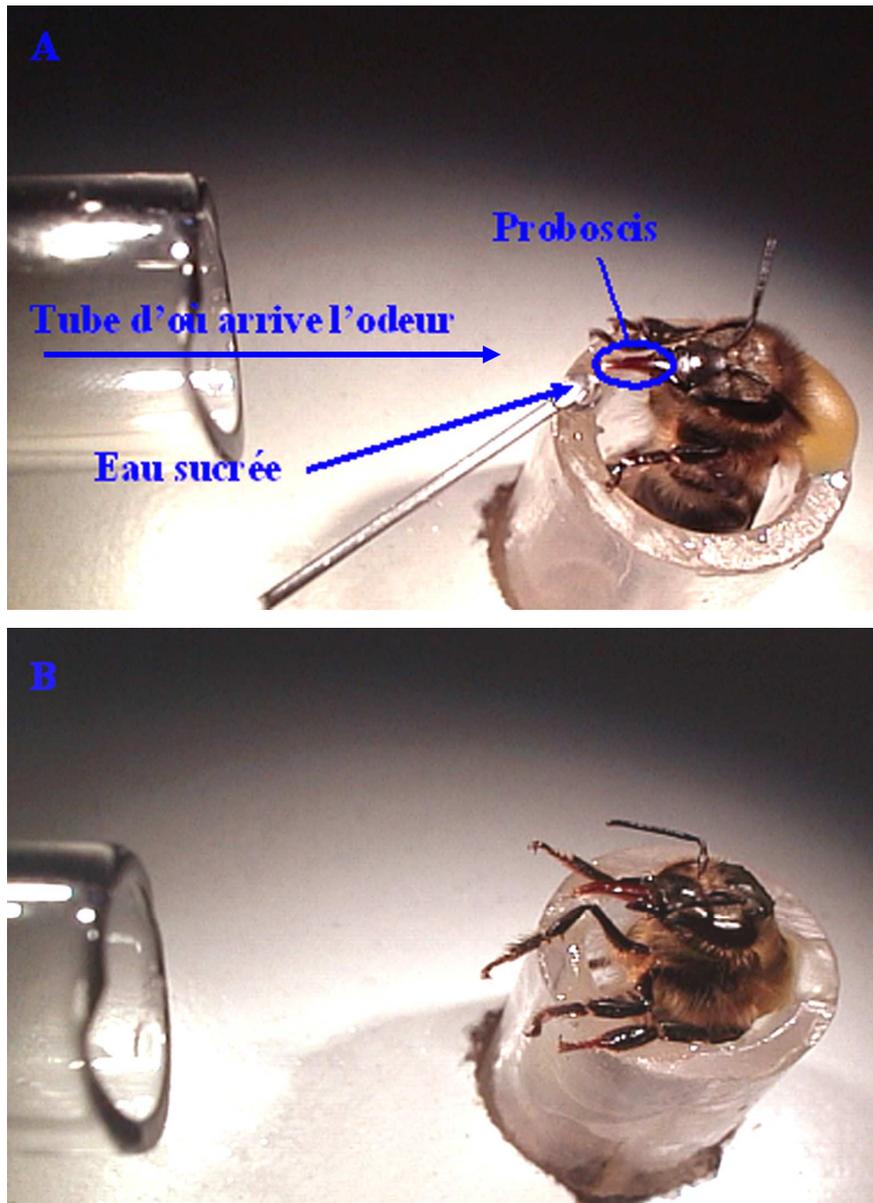


Figure 2 : Le conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis. A : On envoie pendant 4 secondes une bouffée d'odeur vers l'abeille, qui au préalable était déjà placée dans un flux d'air constant. Au bout de 2 secondes, on lui présente une goutte de solution sucrée, ce qui provoque le REP. **B :** par la suite, l'odeur seule est suffisante pour provoquer un REP si l'abeille est conditionnée.

Cet apprentissage comporte également une composante opérante car on peut considérer que l'abeille associe son REP à la récompense sucrée. De fait, la proportion d'abeilles conditionnées diminue fortement si on déclenche le REP sans leur permettre de boire l'eau sucrée (Bitterman et al., 1983). Toutefois, même dans ces conditions l'abeille est capable de former une trace mnésique, comme on le voit lors d'une procédure d'omission. Au

cours de la procédure d'omission, la récompense sucrée n'est délivrée lors de l'apprentissage que si l'abeille ne présente pas de REP conditionné, sinon on ne la lui donne pas (« omission » de la récompense pour les bonnes réponses). Dans ces conditions, sa performance n'est pas affectée, ce qui serait le cas s'il s'agissait d'un apprentissage purement opérant (Bitterman et al., 1983). Le conditionnement olfactif du REP est donc un conditionnement pavlovien. Facile à mettre en œuvre et reproductible, ce protocole a été largement utilisé pour étudier plusieurs aspects de la mémoire de l'abeille. Ainsi, une question posée dans tout conditionnement pavlovien est de savoir quelle est la nature de l'association formée ; en l'occurrence, l'abeille apprend t-elle à associer l'odeur au sucre (association stimulus-stimulus) ou l'odeur au REP (association stimulus-réponse) ? Plusieurs travaux ont postulé une association stimulus-stimulus et ont cherché à savoir comment l'association entre l'odeur et le sucre se fait ; une telle association nécessiterait la convergence dans le cerveau de l'information olfactive et de l'information liée à la récompense (Menzel, 1999 ; Menzel et Giurfa, 2001).

Des protocoles de conditionnements olfactifs pavloviens existent également chez la blatte *Periplaneta americana* (Watanabe et al., 2003) ainsi que chez les papillons, quoique ceux-ci aient surtout été utilisés pour l'étude de la perception olfactive plutôt que pour l'apprentissage (voir par exemple Skiri et al., 2005). Bien que des solutions sucrées appliquées sur les pattes provoquent une extension du proboscis chez les diptères (y compris la drosophile), le REP ne peut pas être conditionné à un stimulus olfactif chez ces espèces. Par contre, on a vu que les drosophiles peuvent apprendre à éviter d'entrer dans un compartiment comportant une odeur donnée si celle-ci a été associée à une décharge électrique (Tully et al., 1994) ; ce protocole a été chez cet insecte autant étudié que le conditionnement olfactif du REP l'a été chez l'abeille.

Autres apprentissages associatifs utilisables en laboratoire

Outre le conditionnement olfactif, il existe deux autres protocoles **d'apprentissage associatif** qui permettent le conditionnement du REP. Tous deux sont des **conditionnements antennaires tactiles du REP** et sont similaires à l'apprentissage olfactif, hormis le fait que l'odeur est remplacée par un stimulus tactile perçu au niveau des antennes (celles-ci sont décrites dans *l'encadré 1* situé page suivante) : il y a donc association entre l'information tactile et le sucre. Dans le premier de ces deux protocoles, l'expérimentateur touche l'antenne de l'abeille avec un cure-dent avant de lui donner la solution sucrée (Giurfa et Malun, 2004). Dans cet apprentissage pavlovien, l'animal n'a aucun contrôle sur le stimulus reçu, il s'agit donc d'une stimulation tactile passive. Par contre, dans le deuxième protocole, c'est l'abeille

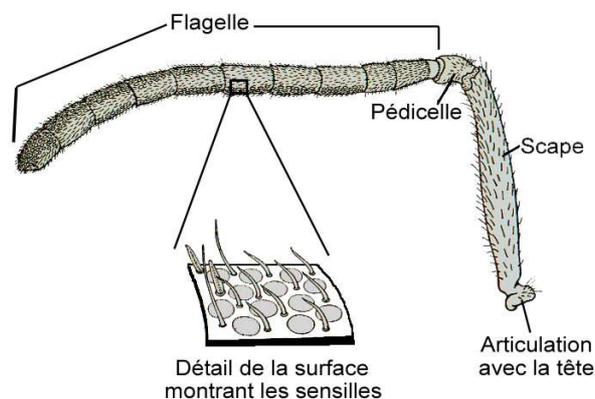
Encadré 1 : l'antenne de l'abeille

Les antennes de l'abeille sont bien développées et comportent trois parties (dessinées ci-dessous) : le **scape**, qui s'articule par le **pédicelle** au **flagelle** (Snodgrass, 1956 ; Goodman, 2003). Quatre muscles situés dans la capsule céphalique assurent la rotation du scape ; ce dernier contient 2 groupes de muscles qui assurent les mouvements du flagelle et du pédicelle (Snodgrass, 1956 ; Goodman, 2003). Les motoneurones correspondant à ces muscles (9 pour ceux du scape, 6 pour ceux du flagelle) ont leurs neurites situées dans le lobe dorsal, le système moteur et mécanosensoriel des antennes (Kloppenburg, 1995 ; Erber et al., 2000).

Les antennes comportent de nombreuses sensilles de différents types (Whitehead et Larsen, 1976b, 1976a). Ces sensilles réagissent à des stimulations tactiles, gustatives ou olfactives. Celles qui réagissent aux informations tactiles ou gustatives se projettent vers le lobe dorsal (Haupt et Barbara, article en préparation). Le lobe antennaire reçoit quand à lui des informations olfactives (Flanagan et Mercer, 1989) et ses propriétés seront abordées dans l'encadré 2 page 48. Lobe dorsal et lobe antennaire sont situés dans le cerveau de l'abeille.

Le pédicelle contient un organe particulier appelé organe de Johnston, qui est sensible aux variations angulaires du flagelle par rapport au scape et détecte de ce fait les vibrations de l'air. Il permet à l'abeille d'évaluer la vitesse de son vol et lui confère en outre une ouïe rudimentaire (Towne et Kirchner, 1989 ; Kirchner, 1993).

Dans la nature, les abeilles se servent de leurs antennes pour percevoir le parfum des fleurs, mais également la texture des pétales (Kevan et Lane, 1985 ; Kevan, 1987). Elles jouent également un rôle essentiel dans les activités réalisées dans la ruche, car elles assurent la perception des phéromones, le suivi des danses en huit qui indiquent les sources de nourritures (Rohrseitz et Tautz, 1999 ; Michelsen, 2003) et le contrôle tactile de la forme des alvéoles (Kevan, 1987). Enfin, dans les expériences réalisées au laboratoire, les antennes jouent un rôle important pour déclencher le REP lors d'une stimulation sucrée ou comme entrée des stimuli olfactifs ou tactiles utilisés dans les conditionnements.



Dessin modifié à partir de Snodgrass (1956), p. 264.

elle-même qui explore une petite plaque métallique située à portée de ses antennes : il s'agit d'une stimulation tactile active, car elle dépend de l'insecte (Erber et al., 1997 ; Erber et al.,

1998). Comme les mouvements des antennes sont mis en jeu dans ce protocole, on parlera d'apprentissage mécanosensoriel pour le distinguer du protocole précédent où l'abeille est passive (apprentissage tactile). Il est possible d'employer des plaques de différentes formes et textures, ce qui permet d'étudier les facultés de discrimination tactile de l'abeille (Erber et al., 1998). Cet apprentissage comporte des caractéristiques tant pavloviennes qu'instrumentales, sans pour autant rentrer spécifiquement dans l'une des deux catégories. Cependant un protocole dérivé de celui-ci repose sur des bases purement opérantes (Kisch et Erber, 1999). Étant donné que lors de l'apprentissage mécanosensoriel et de sa variante opérante les animaux sont aveugles (leurs yeux sont peints en noir), il n'y a pas d'apprentissage visuel de l'approche de la plaque. Toutefois, des mouvements antennaires répondant spécifiquement à des stimuli visuels ont pu être conditionnés avec succès chez l'abeille (Erber et Schildberger, 1980).

Il est important de remarquer que les apprentissages associatifs qui viennent d'être présentés reposent tous sur des bases appétitives. En effet, tous emploient le sucre comme renforcement pour récompenser l'abeille. Il existe cependant un protocole d'apprentissage aversif utilisable chez l'abeille en contention : le **conditionnement olfactif d'extension du dard**. Durant ce protocole, le sucre (stimulus appétitif) est remplacé par une petite décharge électrique (stimulus aversif) qui provoque l'extension du dard. Après plusieurs présentations de ces stimulations, l'animal sort son dard à la simple présentation de l'odeur (Vergoz, 2004).

Apprentissages non associatifs utilisés au laboratoire

Les apprentissages associatifs précédemment décrits sont variés, cependant ils ne sont pas les seuls possibles chez l'abeille en contention. Trois types d'**apprentissage non associatif** ont été rapportés : l'habituation du REP, la sensibilisation et les réponses motrices des antennes. L'**habituation** du REP consiste à appliquer de façon répétée et à intervalles réguliers une solution sucrée sur l'une des antennes de l'abeille (Braun et Bicker, 1992 ; Bicker et Hahnlein, 1994 ; Haupt et Klemm, publication en cours). La première présentation déclenche le REP ; toutefois on ne permet pas à l'abeille de boire la solution. La répétition de ces stimulations non récompensées entraîne finalement une disparition du REP qui n'est pas due à une désensibilisation des sensilles gustatives de l'antenne. Si à ce moment on présente le sucre sur l'antenne controlatérale (ou une solution de plus forte concentration sur la même antenne), un REP est obtenu : ceci indique que l'habituation est un phénomène unilatéral et confirme que l'animal n'a pas cessé de répondre par manque de motivation envers le sucre. De plus, il est également possible de réaliser l'habituation sur les deux antennes. La répétition du protocole d'habituation finit par faciliter celle-ci (c'est-à-

dire que d'une séance à l'autre, il faut de moins en moins de stimulations pour atteindre l'habituation).

Les abeilles qui viennent de recevoir une récompense sucrée sont susceptibles d'avoir un REP pour n'importe quelle nouvelle stimulation (même si cette nouvelle stimulation ne provoque normalement pas le REP), pourvu qu'elle soit présentée dans les secondes qui suivent la présentation du sucre. Ce phénomène est appelé **sensibilisation** et s'observe par exemple si on présente à l'abeille une odeur juste après une solution sucrée. Il a été décrit en détail par Menzel (1990). On pense que la sensibilisation domine les premières secondes de la formation de la trace mnésique après un conditionnement olfactif du REP (Menzel, 1990, 1999).

Une autre forme d'apprentissage non associatif est l'**apprentissage antennaire moteur**. Une abeille en contention agit ses antennes à tout instant. Si on place à leur portée un petit objet, celui-ci sera exploré par l'extrémité de l'antenne par des mouvements rapides et brefs. Une fois que l'on retire l'objet, les mouvements des antennes sont dirigés pendant une dizaine de minutes préférentiellement vers l'emplacement occupé initialement par l'objet (Erber et al., 1993b ; Erber et al., 1997). En outre, certains stimuli visuels peuvent affecter les mouvements d'antennes (Erber et Schildberger, 1980). Ce type de protocole permet d'étudier la plasticité des mouvements d'antenne de l'abeille.

Les différentes phases de la mémoire chez l'abeille : plasticité comportementale

Le conditionnement olfactif du REP peut être appris de trois façons différentes : **apprentissage en un seul essai**, apprentissage en plusieurs essais (généralement trois) séparés d'un bref intervalle (par exemple 1 minute : **apprentissage massé**) et apprentissage en plusieurs essais séparés par un intervalle long (10 minutes ou davantage : **apprentissage distribué**). Plusieurs auteurs ont rapporté que la trace mnésique formée ne dépendait pas de la façon dont elle est apprise : ainsi, Bitterman al. (1983) et Sandoz et al. (1995) ont rapporté que la performance des animaux durant l'apprentissage et jusqu'à 2 semaines après celui-ci ne dépendait pas du nombre d'essais ou des intervalles entre les essais. Dans la nature, les abeilles qui lors d'une trophallaxie apprennent à associer le nectar à l'odeur de la fleur dont il provient forment une trace mnésique stable pendant plusieurs jours en une seule fois (Gil et De Marco, 2005). Selon ces résultats, que l'apprentissage se fasse en un ou trois essais, l'animal forme dans tous les cas une trace mnésique qui persiste plusieurs jours et la plasticité comportementale induite par le conditionnement ne dépendrait pas de la façon dont celui-ci se déroule.

Cependant, plusieurs observations en contradiction avec cette conclusion ont été rapportées ; en fait, certaines odeurs ne peuvent pas mener à une trace mnésique stable plus de quelques heures si elles sont apprises en un seul essai. Selon la nature de l'odeur apprise, la

performance des animaux n'est pas la même. Menzel (1990 ; 1999) a conclu qu'il existait deux formes de mémoire chez l'abeille : une **mémoire à moyen terme** (MMT) et une **mémoire à long terme** (MLT). La MMT ne durerait que quelques heures et disparaîtrait en un jour, et serait présente à la suite de tous les apprentissages (en un ou en plusieurs essais). La MLT, en contrepartie, ne se formerait qu'après un apprentissage en plusieurs essais et serait la seule trace mnésique présente après un jour ; elle coexisterait auparavant avec la MMT. Aussi, une journée après l'apprentissage, seule la trace mnésique formée lors d'un conditionnement en plusieurs essais persisterait. La MLT pourrait même durer toute la vie de l'animal.

Ces deux points de vue discordant sur les différentes formes de mémoire de l'abeille reposent sur la performance des animaux 24 heures après l'apprentissage en un essai ; cette performance dépend en fait de l'odeur employée pour conditionner l'abeille. On pense maintenant que la dissociation entre MMT et MLT repose davantage sur leur support neurobiologique : on les différencie sur la base de processus cellulaires qui seraient spécifiques à la MLT. Par exemple, la synthèse de NO (monoxyde d'azote) ne se produit que pendant un apprentissage en plusieurs essais et est nécessaire à la formation de la MLT (Müller, 1996). Dans le travail rapporté ici, la nomenclature suivante a donc été suivie : on appellera **MLT** la mémoire reposant sur la **synthèse de NO** qui sous-tend la performance des animaux un jour après un apprentissage en plusieurs essais, les **autres formes de mémoires** (celle qui existe pendant les premières heures suivant un apprentissage en plusieurs essais ainsi que celle qui est formée lors d'un apprentissage en un seul essai) correspondant à la **MMT**. La nécessité d'un apprentissage en plusieurs essais pour former une MLT a déjà été mentionnée plus haut chez d'autres invertébrés (limnée, seiche ...). Chez le crabe *Chasmagnathus*, on a vu qu'un apprentissage en plusieurs sessions change le contenu de la trace mnésique (elle induit un apprentissage du contexte). Cette distinction est semblable à celle qui existe chez la drosophile, où on appelle MLT la mémoire nécessitant la synthèse de protéines après un apprentissage distribué. Il semblerait donc que la MLT de l'abeille et celle de la drosophile correspondent à des processus comparables.

Le nombre d'essais d'apprentissage est donc une première source de diversité dans les traces mnésiques bâties lors du conditionnement olfactif. Cependant les apprentissages en plusieurs essais peuvent être soit massés, soit distribués, selon **l'intervalle laissé entre les essais d'apprentissage**. Cet intervalle joue un rôle essentiel dans la formation de la trace mnésique (Gerber et al., 1998 ; Gerber et Menzel, 2000 ; Menzel et al., 2001). L'apprentissage massé avec un intervalle de 1 minute ou l'apprentissage distribué avec un intervalle de 10 minutes ou plus mènent à la formation de la MLT. Par contre, un intervalle trop court (30 secondes) aboutit à de mauvaises performances des animaux car lorsque l'odeur est présentée quelques secondes après

une récompense sucrée (ce qui est le cas si on enchaîne rapidement les présentations odeur/sucre/odeur/sucre), il se forme un apprentissage inhibiteur qui entre en concurrence avec le conditionnement (Hellstern et al., 1998 ; voir aussi chez la drosophile Tanimoto et al., 2004).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont indiqué que la MLT formée dépendait de l'intervalle entre les essais : si l'apprentissage est **massé** (1 minute), on forme une **MLT précoce**, tandis que si l'apprentissage est **distribué** (10 minutes ou plus), on forme une **MLT tardive**, cette dernière étant la seule à requérir la synthèse de nouvelles protéines. La MLT tardive ne peut être dissociée que plus de trois jours après l'apprentissage (Menzel et al., 1993; Wittstock et al., 1993; Wustenberg et al., 1998; Menzel et al., 2001). Cette situation est semblable à celle que l'on observe pour la MLT de la drosophile (Tully et al., 1994).

Ces observations indiquent clairement que l'association de l'odeur et du sucre ne génère une **plasticité comportementale** que dans des circonstances temporelles bien précises. Il existe même différentes formes de plasticité (MMT et MLT) selon la façon dont se déroule l'apprentissage.

Les facteurs qui modulent la mémoire

Plusieurs éléments peuvent moduler la trace mnésique formée lors du conditionnement olfactif du REP. Les **caractéristiques de l'odeur** apprises sont un paramètre important. Menzel (1985) a rapporté que si n'importe quelle odeur peut être associée au sucre en théorie, certaines (en général des odeurs présentes dans le parfum des fleurs) sont beaucoup mieux apprises que d'autres. De plus, plus une odeur est concentrée, plus elle sera facile à apprendre et à discriminer d'autres odeurs (Bhagavan et Smith, 1997 ; Pelz et al., 1997). Les abeilles sont capables d'apprendre à répondre à une forte concentration d'odeur et à ne pas répondre à une faible concentration de la même odeur, par contre elles ne peuvent pas acquérir la tâche inverse (Bhagavan et Smith, 1997).

Le contenu de l'apprentissage dépend fortement de la nature de l'odeur. Le conditionnement olfactif du REP a permis d'étudier la perception des odeurs et les capacités de discrimination olfactive des abeilles. Par exemple, un mélange de deux odeurs (A et B) est présenté à une abeille sans que celle-ci n'ait de réaction particulière. L'animal est ensuite conditionné à l'odeur A, et a donc des REP conditionnés pour cette odeur. On observe alors que l'odeur B, qui n'a pas fait l'objet de l'apprentissage, induit également un REP. En fait, présenter ensemble les deux odeurs avant le conditionnement suffit à créer une association entre elles en dépit de l'absence de récompense sucrée ; les informations obtenues sur A lors de l'apprentissage sont transmises à B. Ce transfert d'information d'une odeur à l'autre est appelé préconditionnement (Müller et al., 2000). L'abeille peut aussi être entraînée à inverser la tâche

apprise. Dans un tel protocole, elle apprend que l'odeur A est associée au sucre (A+) est que l'odeur B n'est pas récompensée (B-). L'odeur A, mais pas l'odeur B, déclenche donc un REP conditionné. Si on conditionne les abeilles à inverser régulièrement la tâche apprise (passant ainsi de A+ B- à A- B+ à plusieurs reprises), l'animal modifie de plus en plus vite son comportement (Komischke et al., 2002). Mais les résultats les plus intéressants sont obtenus avec des apprentissages non élémentaires, c'est-à-dire des apprentissages au cours desquels des informations potentiellement contradictoires sont données aux abeilles (Giurfa, 2003). Ainsi, si A et B sont deux odeurs et AB leur mélange, les abeilles sont capables d'apprendre A+, B+, AB- ou A-, B-, AB+ (Deisig et al., 2001 ; Komischke et al., 2003). Des variantes sophistiquées de ce protocole ont indiqué que les abeilles forment des représentations pour les mélanges d'odeurs pures qui sont distinctes du simple cumul des représentations des odeurs isolées (Deisig et al., 2002).

On vient de voir l'importance des odeurs (stimulus conditionné) dans la formation de la représentation. De la même manière, le sucre (récompense) influence la plasticité mnésique. Aussi, deux paramètres ont un rôle important : la **concentration de la solution sucrée** et la **sensibilité au sucre** des animaux.

Bitterman et al. (1983) ont rapporté qu'une faible concentration en sucre augmentait le nombre d'essais requis pour atteindre l'asymptote de la courbe d'acquisition sans toutefois modifier celle-ci (l'asymptote est le pourcentage maximum d'abeilles conditionnées). Des abeilles rassasiées (qui ne sont donc pas très motivées pour le sucre) sont capables d'apprendre le conditionnement olfactif du PER, même si elles ont d'assez mauvaises performances (Laffray, 2003). Les travaux de Scheiner et ses collaborateurs (Scheiner, 2001 ; Page et Erber, 2002 ; Scheiner et al., 2004) ont indiqué que la performance des animaux est directement proportionnelle à leur sensibilité au sucre : des animaux ayant une forte sensibilité au sucre se conditionnent mieux, sans doute parce que l'effet renforçateur de la solution sucrée est plus efficace chez eux. De même, des abeilles très sensibles au sucre ont plus de difficultés à perdre leur REP lors de l'habituation (Scheiner, 2004).

La sensibilité au sucre est un facteur important dans la biologie de l'abeille, car elle influence grandement la division du travail au sein de la ruche (Page et Erber, 2002) ; Pankiw et Page (1999) ont montré que les abeilles les plus sensibles au sucre sont celles qui récoltent du pollen, tandis que les abeilles moins sensibles au sucre récoltent du nectar (étant moins sensibles au sucre, elles ne prennent que les meilleurs sources de nectar). En modulant l'importance perçue de la récompense, la sensibilité au sucre joue un rôle crucial dans la plasticité du comportement des abeilles, et au-delà dans la plasticité du comportement de la ruche entière.

La sensibilité au sucre a une base génétique, et il existe une souche d'abeilles très sensible au sucre et une autre moins sensible (Page et al., 1998); ces deux souches diffèrent par l'abondance de la protéine kinase A (Humphries et al., 2003), une enzyme dont le rôle dans la mémoire sera abordé par la suite. Les animaux issus de la première souche apprennent mieux que ceux issus de la seconde et ils collectent plus du pollen; si on prend des abeilles venant de l'une ou l'autre de ces souches mais ayant une même sensibilité au sucre, alors il n'y a plus de différence (Scheiner et al., 2001a, 2001b). Cette observation explique qu'il soit possible de sélectionner des abeilles qui apprennent plus ou moins bien (Brandes et Menzel, 1990): on sélectionne en fait dans ce cas des animaux qui sont plus ou moins sensibles à la récompense.

D'autres paramètres peuvent également influencer le conditionnement olfactif du REP. **L'âge** des animaux en est un (Pham-Delègue, 1990): des abeilles âgées apprennent moins bien (Tofilski, 2000), de même que des abeilles très jeunes (moins de 6 jours; Ray et Ferneyhough, 1997b). Toutefois, les mauvaises performances des jeunes abeilles s'expliquent par le fait que dans des conditions habituelles elles ne butinent pas avant l'âge de 3 semaines environ (Winston, 1987); des abeilles de 3 jours forcées de butiner ont des performances d'apprentissage identiques à celles d'animaux plus âgés (Fahrbach et Robinson, 1996; Ray et Ferneyhough, 1999). C'est donc en fait le rôle des abeilles dans la ruche qui détermine leurs facultés d'apprentissage, les butineuses étant celles qui apprennent le mieux. En fait, les abeilles les plus jeunes ne commencent à butiner que lorsque leur sensibilité au sucre augmente (Pankiw et Page, 1999). Enfin, la performance des animaux dépend de la **saison** (Ray et Ferneyhough, 1997a), ce qui s'explique facilement lorsqu'on sait que la sensibilité au sucre des animaux varie également au cours de l'année (Scheiner et al., 2003a): les températures trop faibles ou trop élevées la diminuent. De même, de mauvaises **conditions climatiques** diminuent les performances (Riessberger et Crailsheim, 1997). Enfin, des abeilles dont le **système immunitaire** est activé apprennent également moins bien (Mallon et al., 2003).

Neuroanatomie fonctionnelle de l'apprentissage chez l'abeille

Le cerveau des insectes sous-tend la formation des traces mnésiques (celui de l'abeille est représenté *figure 3*). Il est divisé en trois parties: le protocérébron (constitué des corps pédonculés, des lobes optiques, des lobes protocérébraux et du complexe central), le deutocérébron (constitué des lobes antennaires et des lobes dorsaux) et le tritocérébron, qui est d'une taille très réduite. Sur la face ventrale du cerveau, on trouve le ganglion sous œsophagien (GSO) qui reçoit des afférences du proboscis et contient les motoneurones innervant les pièces buccales.

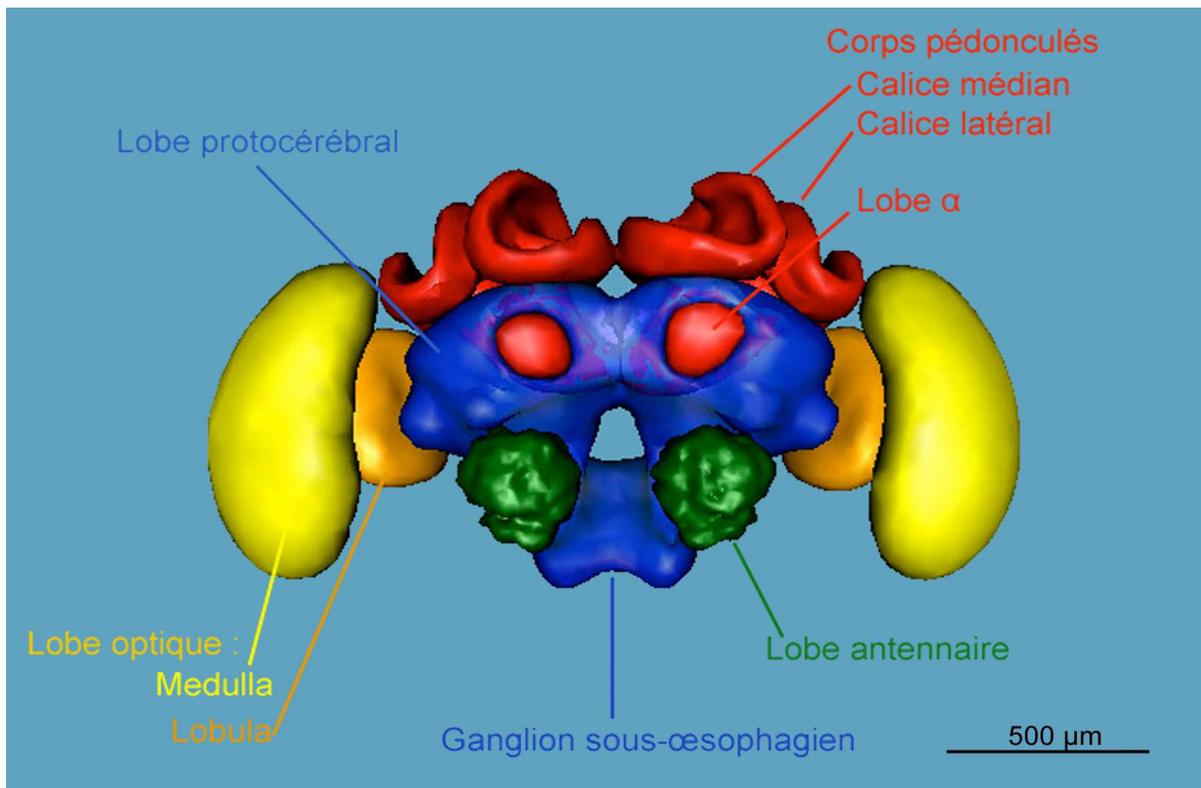


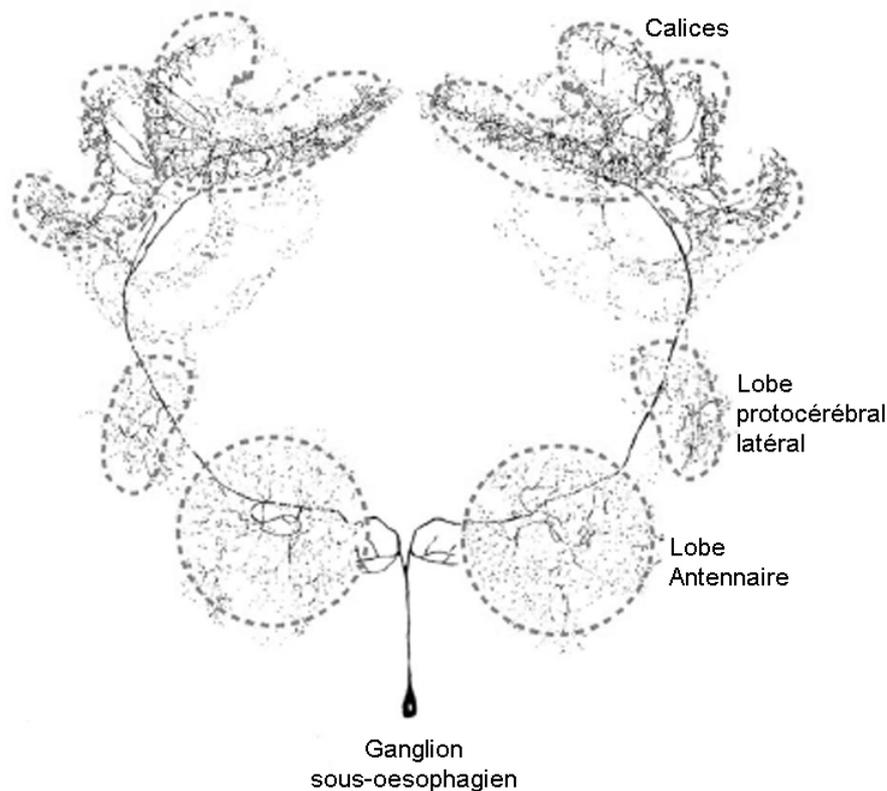
Figure 3 : reconstitution en trois dimensions du cerveau de l'abeille vu de face (image réalisée par Robert Brandt, Berlin). Le lobe β des corps pédonculés n'est pas visible ici (il est situé perpendiculairement au lobe α et derrière le lobe protocérébral), ni le complexe central (situé entre les corps pédonculés), le tritocérébron et les lobes dorsaux (situés derrière les lobes antennaires).

Le ganglion sous-œsophagien

Le **ganglion sous-œsophagien** (ou GSO) reçoit des informations gustatives et tactiles en provenance des neurones sensoriels du proboscis, qui envoient aussi quelques axones vers le tritocérébron, derrière le lobe dorsal (Haupt et Barbara, article en préparation) ; il contient également les motoneurones contrôlant les muscles du proboscis (Rehder, 1989) et envoie des projections vers les calices des corps pédonculés (Schröter et Menzel, 2003). L'activité des muscles du proboscis change suite à l'apprentissage (Gauthier et Richard, 1992). Compte tenu du fait que ces muscles sont innervés par des motoneurones du GSO, il est possible que celui-ci soit l'un des supports de la trace mnésique, sans que l'on en sache davantage à ce sujet.

Parmi les projections reliant le GSO aux corps pédonculés, on trouve celles d'un neurone très particulier, le neurone **VUMmx1** ; ce neurone unique et impair se projette dans les lobes antennaires, les calices des corps pédonculés et les lobes protocérébraux. Ce

neurone répond aux stimulations sucrées (sans déclencher le REP) et ne répond pas initialement à la stimulation odorante. La dépolarisation électrique de cette cellule peut remplacer la solution sucrée dans le conditionnement olfactif du REP (Hammer, 1993). L'arborisation du VUMmx1 dans le cerveau est présentée *figure 4*. Ce neurone est octopaminergique, et si on remplace la stimulation sucrée par une injection d'octopamine localisée dans le lobe antennaire ou les calices des corps pédonculés, les abeilles se conditionnent comme si elles avaient reçu une stimulation sucrée ; l'injection d'octopamine dans le lobe protocérébral n'a cependant pas d'effet (Hammer et Menzel, 1998). A l'issue du conditionnement, le VUM est activé par la présentation de l'odeur conditionnée ; il a donc été proposé que ce neurone représente le circuit du renforcement sucré.



D'après Menzel et Giurfa (2001).
Copyright Elsevier Science Ltd.

Figure 4 : l'arborisation du neurone VUMmx1 dans le cerveau.

Le deutocérébron

Le deutocérébron reçoit des afférences en provenance des antennes et contient les motoneurones innervant les muscles des antennes. Il comporte deux structures : d'une part les lobes antennaires (voir la *figure 5*), qui reçoivent les afférences olfactives (voir page suivante *l'encadré 2* pour une présentation de sa structure particulière et de l'olfaction chez les insectes) ; et d'autre part les lobes dorsaux qui reçoivent les afférences mécanosensorielles et gustatives, et contiennent les neurites des motoneurones qui contrôlent les muscles innervant l'antenne. Étant donné que le lobe antennaire est impliqué dans le traitement des informations olfactives, il est logique de rechercher son éventuelle implication dans la formation de la trace mnésique lors de l'apprentissage olfactif.

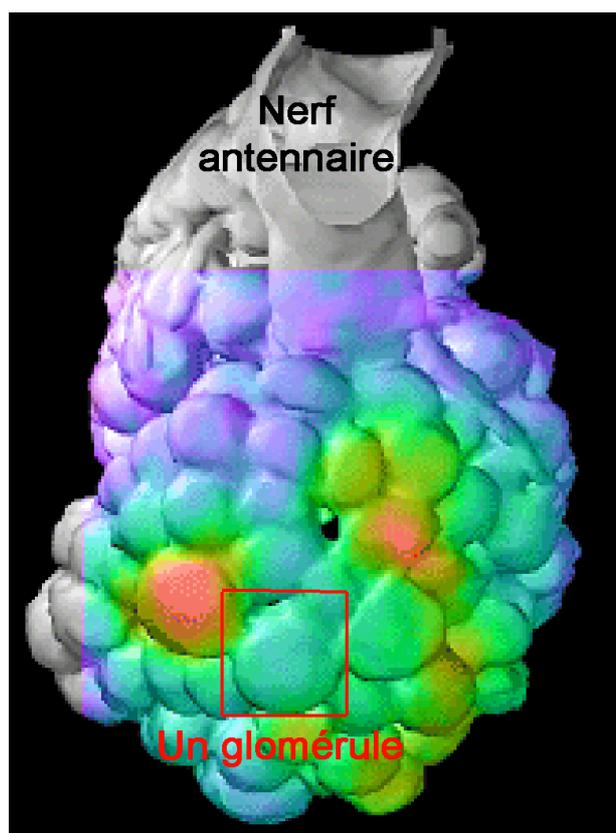


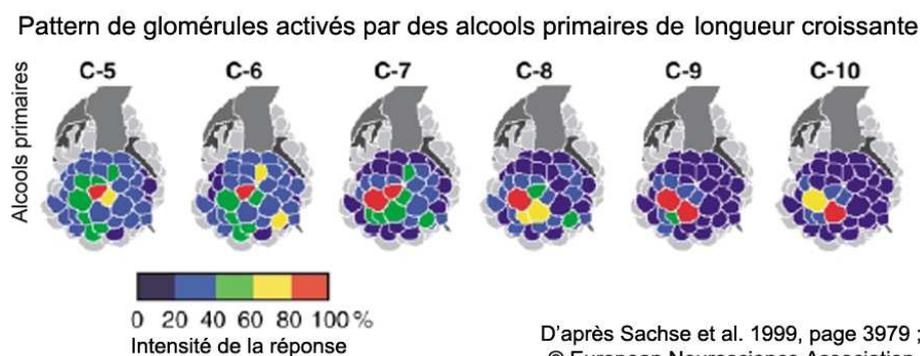
Figure 5 : le lobe antennaire. On distingue les renflements périphériques nommés glomérules.

Encadré 2 : le lobe antennaire, l'imagerie calcique et l'olfaction

Le lobe antennaire des insectes est le **premier relais de l'information olfactive** dans le système nerveux central (Homberg et al., 1989 ; Galizia et al., 1999 ; Galizia et Menzel, 2001). Il reçoit des projections des sensilles olfactives de l'antenne (mais pas d'information gustative ou mécanosensorielle). La périphérie du lobe antennaire est constituée de petits renflements sphériques nommés glomérules (voir la *figure 5* page précédente). Chaque glomérule comporte une coiffe et une zone médullaire ; la coiffe est le site des connexions synaptiques entre les neurones de l'antenne et les neurones se projetant vers les lèvres des calices des corps pédonculés et le lobe protocérébral (Abel et al., 2001 ; Müller et al., 2002). De nombreux interneurons régulent l'activité des neurones de projection, ce qui fait du lobe antennaire le premier site de modulation et de traitement de l'information olfactive (Sachse et Galizia, 2002, 2003). Cette organisation glomérulaire est semblable à celle du bulbe olfactif des mammifères.

Galizia et al. (1997) ont développé un protocole **d'imagerie calcique** permettant d'enregistrer chez une abeille vivante les variations de la concentration cytosolique des ions Ca^{2+} au sein des glomérules, ce qui reflète leur activité. Grâce à cette technique, on a découvert que la perception d'une odeur génère un pattern temporel d'activité dans le lobe antennaire (Joerges et al., 1997) interprété comme l'activation sélective de certains glomérules (l'image ci-dessous donne l'exemple des alcools primaires). Les odeurs sont donc représentées dans le cerveau de l'abeille comme un pattern d'activation de glomérules spécifiques (Sachse et al., 1999). Cette technique a donné les mêmes résultats chez la fourmi *Camponotus sp* (Dupuy, 2004) et la drosophile (Wang et al., 2003).

En aval des lobes antennaires, le traitement de l'information olfactive se poursuit dans les corps pédonculés (Stopfer et al., 2003) ; les neurones des calices synchronisent leur activité et leurs potentiels membranaires se mettent à osciller de concert lorsqu'une odeur est perçue (Laurent, 2002). Si on inhibe ces oscillations à l'aide d'une drogue nommé picrotoxine, les abeilles n'arrivent plus à distinguer des odeurs chimiquement proches, mais distinguent toujours celles qui sont très différentes (Stopfer et al., 1997 ; Hosler et al., 2000).



L'une des premières techniques mise en œuvre pour tenter de savoir quelles zones du cerveau de l'abeille pouvaient être impliquées dans le conditionnement olfactif du REP consistait à refroidir de façon focalisée certaines zones du cerveau de l'abeille (Menzel et al., 1974) après l'apprentissage, ce qui inhibe temporairement leur activité. Erber et al. (1980) ont ainsi montré que le lobe antennaire est essentiel à la consolidation de la trace mnésique pendant les 3 minutes qui suivent l'acquisition. De la même façon, Müller (2000) a indiqué que l'activité de la protéine kinase A dans le lobe antennaire conditionnait la formation de la MLT. La technique d'imagerie calcique présentée dans *l'encadré 2* a permis d'éclaircir cet aspect et a montré que le lobe antennaire est un **site de traitement des informations olfactives**.

Ainsi, en enregistrant l'activité calcique dans le lobe antennaire pendant une stimulation olfactive, on peut établir quelle est la représentation de l'odeur au sein des glomérules. Faber et al. (1999) ont montré que cette représentation était modifiée par l'apprentissage, c'est-à-dire que la carte des glomérules activés pour cette odeur devient plus nette et plus active par rapport à une odeur similaire, mais non conditionnée. Par la suite, l'emploi de la même technique lors d'apprentissages unilatéraux (l'odeur n'est apprise que d'un côté du cerveau, donc un seul lobe antennaire est mis en jeu) a indiqué que cette différenciation apparaît entre les deux lobes antennaires (Sandoz et al., 2003) : la trace de l'apprentissage est limitée au lobe antennaire sollicité, comme le suggéraient les résultats obtenus en conditionnement (Sandoz et Menzel, 2001 ; Sandoz et al., 2002).

A l'aide d'un marquage histochimique de l'activité de la cytochrome oxydase (enzyme essentielle à la respiration cellulaire), il est possible de mesurer l'activité neuronale (Wong-Riley, 1979, 1989 ; Armengaud et al., 2000 ; Sakata et al., 2005). A l'aide de tels marquages, Déglise et al. (2003) ont montré qu'une minute après un apprentissage olfactif en cinq essais, on observait une hausse d'activité dans certaines parties du lobe antennaire, ce qui correspond aux résultats obtenus en imagerie calcique. L'ensemble de ces observations indique clairement l'importance du lobe antennaire dans les apprentissages olfactifs : son rôle ne se limite pas seulement à la perception de l'odeur mais également à la formation de la trace mnésique. Il pourrait contribuer à associer les informations sur l'odeur et celles sur la récompense sucrée qu'il reçoit par le neurone VUMmx1.

Par analogie avec le rôle du lobe antennaire dans l'apprentissage olfactif, on pense que le **lobe dorsal** joue un rôle essentiel dans la plasticité neurobiologique sous-tendant les apprentissages tactiles ou mécanosensoriels. En effet, ce neuropile reçoit les

informations mécaniques tactiles en provenance de l'antenne et contrôle ses mouvements, bien que des synapses entre les motoneurones des muscles antennaires et les afférences tactiles de l'antenne n'aient pas été identifiées (Kloppenburger, 1995). On ne sait pas si le lobe dorsal se projette dans d'autres régions du cerveau. Peu de travaux lui ont été consacrés : la seule étude publiée porte sur le rôle d'un motoneurone au cours de l'apprentissage mécanosensoriel opérant décrit par Kisch et Erber (1999). Des enregistrements électrophysiologiques ont indiqué que ce conditionnement était réductible aux mouvements d'un muscle situé dans le scape (ce muscle bouge le flagelle de l'antenne, voir *l'encadré 1* page 38) : de même que Kisch et Erber (1999) avaient conditionné l'abeille à augmenter la fréquence de ses mouvements d'antennes pour recevoir une récompense sucrée, Erber et al. (2000) ont réussi à conditionner l'abeille à augmenter la fréquence avec laquelle ce muscle se contracte. L'activité de ce muscle est directement corrélée à celle d'un motoneurone du lobe dorsal, qui serait donc un **substrat neuronal de la plasticité** lors de ce conditionnement ; toutefois, l'activité de ce motoneurone ne varie pas suite à l'apprentissage.

Le lobe dorsal joue donc un rôle essentiel dans la perception antennaire tactile et mécanosensorielle, mais semble être **la seule partie du cerveau à traiter ces informations** et n'envoie pas d'axones vers d'autres neuropiles (Kloppenburger, 1995 ; Haupt et Barbara, article en préparation). En particulier, il n'y a pas de connexion entre le lobe dorsal et les corps pédonculés (voir ci-dessous). Pourtant, ceux-ci reçoivent des informations mécanosensorielles : en effet, le neurone Pe1 (qui reçoit des informations dans les corps pédonculés) répond à des stimulations mécaniques de l'antenne. En dehors de l'olfaction, les voies nerveuses qui sous-tendent la perception antennaire restent donc à découvrir.

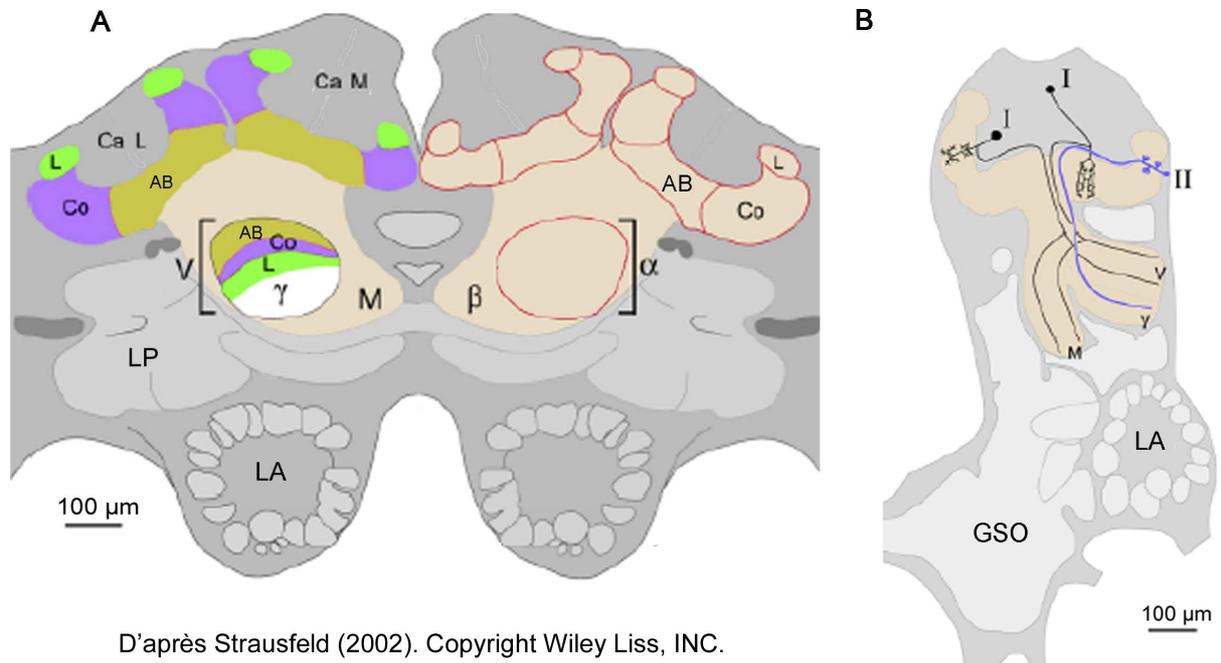
Le lobe dorsal reçoit également les **informations gustatives** en provenance de l'antenne (Haupt et Barbara, article en préparation). Il pourrait donc être impliqué dans le déclenchement du REP. Cependant, on sait peu de choses à ce sujet ; outre le fait qu'on a longtemps cru à tort que c'était le lobe antennaire qui recevait l'information gustative, le travail consacré au neurone VUMmx1 du GSO (Hammer, 1993 ; Hammer et Menzel, 1998) a contribué à maintenir dans l'ombre le rôle du lobe dorsal dans ce domaine.

Le protocérébron

La majeure partie du cerveau des insectes est formée par le **protocérébron**. Celui-ci comprend deux **lobes optiques** volumineux placés de part et d'autre de la tête. Chacun d'eux est associé à la rétine des yeux composés et comporte trois neuropiles appelés lamina, medulla et lobula. Ehmer et Gronenberg (2002) ont indiqué que la medulla et la lobula se projettent vers le

collier des calices des corps pédonculés (voir ci-dessous). De plus, la lobula envoie des informations vers le lobe dorsal -ce qui explique les mouvements antennaires induits par la perception de certains stimuli visuels (Erber et Schildberger, 1980 ; Erber et Kloppenburg, 1995 ; Kloppenburg et Erber, 1995). Les lobes optiques sont peut être impliqués dans les apprentissages visuels de l'abeille en vol libre, mais on ne sait que peu de choses à ce sujet.

Les **corps pédonculés** (voir la *figure 6* et l'encadré 3 page suivante pour le détail de leur anatomie) occupent une importante partie du protocérébrun des arthropodes et des annélides. Ils sont constitués par de petits neurones appelés **cellules de Kenyon**. Les corps pédonculés des insectes ont fait l'objet de nombreuses études depuis le 19^{ème} siècle (voir les synthèses de Mobbs, 1982 ; Mobbs, 1984 ; Heisenberg, 1998 ; Menzel, 1999 ; Menzel et Giurfa, 2001 ; Heisenberg, 2003 ; les tout premiers travaux : Dujardin, 1850, 1853 ; Viallanes, 1887a, b, 1893 ; Kenyon, 1896a, b sont cités dans Strausfeld et al., 1998). Ils reçoivent des informations olfactives en provenance du lobe antennaire et des informations gustatives en provenance du GSO (notamment des afférences du VUMmx1) : ils constituent donc un site de convergence pour les différents stimuli impliqués dans le conditionnement (l'odeur et le sucre).



D'après Strausfeld (2002). Copyright Wiley Liss, INC.

Figure 6 : anatomie des corps pédonculés (A coupe frontale, B coupe latérale). L : lèvre du calice et ses projections dans le lobe α . Co : collier et sa projection dans le lobe α . AB : anneau basal et sa projection dans le lobe α . γ : lobe γ . V, α : lobe α (ou lobe ventral). M, β : lobe β , (ou lobe médian). Ca L : calice latéral. Ca M : calice médian. LA : lobe antennaire. LP : lobe protocérébral. GSO : ganglion sous-œsophagien. I et II : exemple d'arborisation de cellule de Kenyon de type I et II.

Encadré 3 : les corps pédonculés

Les **corps pédonculés** se composent de deux gros **calices** se prolongeant par un pédoncule divisé en deux lobes : le **lobe α** (ou lobe vertical) et le **lobe β** (voir la *figure 6* page précédente). Ils sont constitués par les neurites de petites cellules nommées **cellules de Kenyon** (environ 85000 par corps pédonculé). Il existe des cellules de Kenyon de type I et des cellules de type II, appelées également cellules griffues (voir *figure 6B*). Les somas des **cellules de type I** sont situés à l'intérieur des calices et envoient des axones bifides (un par cellule) formant le lobe α et le lobe β (Strausfeld, 2002). Chacune des cellules de Kenyon de type I reçoit des informations dans une des trois zones des calices (Gronenberg, 2001 ; Gronenberg et Lopez-Riquelme, 2005) : les lèvres, qui reçoivent des afférences olfactives du lobe antennaire (Abel et al., 2001 ; Müller et al., 2002), le collier, qui reçoit des afférences visuelles (Ehmer et Gronenberg, 2002), et l'anneau basal, qui reçoit des afférences de plusieurs modalités sensorielles. Les axones des cellules de Kenyon de type I se projettent de façon stratifiée dans le lobe α et le lobe β , l'anneau basal, le collier et les lèvres des calices correspondant chacun à une série de strates (voir *figure 6A*). Les **cellules de Kenyon de type II** (Strausfeld, 2002) apparaissent les premières lors du développement de l'abeille (Farris et al., 2004) ; leurs somas se trouvent à l'extérieur des calices, elles reçoivent des afférences dans tout le calice et se projettent dans le **lobe γ** , qui constitue la partie inférieure du lobe α .

En dépit de sa complexité, cette description est loin d'être complète. En effet, le lobe α reçoit des afférences directement du lobe protocérébral et y envoie également des projections (Rybak et Menzel, 1993) comme par exemple le neurone Pe1. De même, la subdivision du calice en lèvre, collier et anneau basal peut être encore affinée en fonction de l'origine exacte des afférences reçues (Gronenberg, 2001 ; Gronenberg et Lopez-Riquelme, 2005).

L'existence de calices volumineux est un trait évolué spécifique des hyménoptères (guêpes, fourmis, abeilles). Chez d'autres insectes, les calices sont beaucoup plus réduits, voire absents (Strausfeld et al., 1998 ; Farris, 2005). La présence chez l'abeille de doubles calices très développés pourrait être une adaptation aux exigences de la vie de butineuse ou de la vie sociale. Ainsi, le développement des calices pourrait être associé à la détection des odeurs florales ; des insectes plus primitifs, apparus avant les plantes à fleurs, n'ont pas de calices. Cette hypothèse est cohérente avec la maturation observée dans les corps pédonculés lors de l'apparition du comportement de butinage (Fahrbach et al., 1998 ; Fahrbach et al., 2003).

De très nombreux travaux ont montré l'importance des corps pédonculés dans la **formation de la trace mnésique** chez l'abeille. Oleskevich (1997) a montré à l'aide de stimulations électriques qu'il existe une **plasticité synaptique** à long terme dans ce neuropile : des stimulations électriques dans le lobe antennaire provoquent une potentialisation des cellules de Kenyon, c'est-à-dire qu'elles répondent plus facilement à de nouvelles stimulations après la première stimulation. De plus, les lèvres du calice (qui reçoivent l'information olfactive en provenance des lobes antennaires) sont activées lors de l'apprentissage olfactif, ce qui a été observé par Faber et Menzel (2001) en imagerie calcique et par l'histochimie quantitative de la cytochrome oxydase par Déglise et al. (2003). En outre, Cano Lozano et al. (2001) ont rapporté que les calices sont nécessaires à l'acquisition d'un apprentissage olfactif en un essai, tandis que les lobes α sont indispensables pour la restitution des informations apprises. Refroidir le lobe α ou les calices montre que ces zones interviennent dans les processus de consolidation durant les minutes qui suivent l'acquisition (Erber et al., 1980).

Lorsqu'une abeille commence sa vie de butineuse (les plus jeunes abeilles ne butinent pas encore), ses corps pédonculés grossissent et se développent (Fahrbach et Robinson, 1996) sous l'effet de l'hormone juvénile (une hormone essentielle à la maturation des insectes) ; traiter des abeilles de 3 jours avec de l'hormone juvénile améliore la MMT, mais pas la MLT (Maleszka et Helliwell, 2001). La relation entre le développement des corps pédonculés et le début de la vie de butineuse de l'abeille est complexe, car ceux-ci se développent en réponse à l'apparition du comportement de butinage mais sont également capables d'atteindre leur maturation avant qu'il ne se manifeste (Fahrbach et Robinson, 1996 ; Fahrbach et al., 1998 ; Fahrbach et al., 2003).

L'importance des corps pédonculés dans la mémoire a été rapportée chez d'autres espèces d'insectes. Chez la drosophile, il est bien établi que le lobe α est impliqué dans le rappel de la MLT lors du conditionnement olfactif (Dubnau et al., 2001 ; McGuire et al., 2001 ; Pascual et Préat, 2001 ; Isabel et al., 2004), mais cela ne semble pas être le cas dans d'autres apprentissages (Wolf et al., 1998). Chez la blatte *Periplaneta americana*, les corps pédonculés sont impliqués dans la mémoire spatiale (Mizunami et al., 1998). Des grillons *Acheta domesticus* élevés en milieu enrichi (environnement riche en stimulations) montrent davantage de neurogénèse (formation de nouveaux neurones) dans les corps pédonculés que ceux élevés en milieu appauvri (Scotto-Lomassese et al., 2000). Si on détruit les neuroblastes à l'origine des nouvelles cellules des corps pédonculés, la performance des animaux diminue dans un apprentissage consistant à trouver la sortie d'une enceinte à partir d'indices visuels ou olfactifs (Scotto-Lomassese et al., 2003). Mais comme aucune neurogénèse n'a été trouvée chez l'abeille adulte (Fahrbach et al., 1995), de nouveaux neurones ne semblent pas nécessaires pour former la mémoire de cet insecte.

La majeure partie du protocérébron est constituée par le **lobe protocérébral** ; il se compose du lobe protocérébral latéral et du lobe protocérébral *stricto sensu*. En dépit de sa taille, on sait très peu de choses sur son éventuelle fonction dans la mémoire de l'abeille. On pense qu'il pourrait être impliqué au moins dans l'apprentissage olfactif, car comme on l'a vu précédemment, il reçoit des afférences du lobe antennaire (Abel et al., 2001 ; Müller et al., 2002) et du neurone VUMmx1 (Hammer, 1993). De plus, il reçoit des afférences du lobe α du corps pédonculé ipsilatéral et l'innerve à son tour (Rybak et Menzel, 1993) ; d'autres zones du cerveau lui sont connectées (Iwama et Shibuya, 1998). Ainsi, de nombreux neurones extrinsèques aux corps pédonculés se projettent en feedback des lobes α et β vers les calices (Grünewald, 1999 ; Strausfeld, 2002).

Un neurone particulier du lobe protocérébral, le **neurone Pe1**, a été décrit en détail par Muelshagen (1993) et Rybak et Menzel (1998). Ce neurone reçoit des informations dans le pédoncule des corps pédonculés et se projette dans le lobe protocérébral. Il répond à tous les stimuli testés (visuel, olfactif, gustatif ou mécanosensoriel) par une hausse de son activité. Lors d'un apprentissage olfactif, sa réponse à l'odeur conditionnée est transitoirement modifiée : ceci suggère qu'il pourrait jouer un rôle dans la formation de la trace mnésique. Néanmoins, toutes ces informations sur le neurone Pe1 ne sont pas suffisantes pour donner une idée précise du rôle du lobe protocérébral dans la mémoire, qui à ce jour reste très mal connu.

Outre les lobes optiques, les corps pédonculés et les lobes protocérébraux (qui sont tous des structures paires), le protocérébron comprend également une structure impaire, le **complexe central**. Celui-ci comprend deux neuropiles sphériques (les tubercules ventraux), le pont protocérébral et le corps central (ou corps en éventail), lui-même composé d'une division supérieure et d'une division inférieure (cette dernière étant également appelée corps ellipsoïde). En dépit de cette nomenclature détaillée, on ignore à peu près tout de ses fonctions. Toutefois, en enregistrant la réponse à divers stimuli des interneurons du complexe central, Homberg (1985) a indiqué que le pont protocérébral jouait un rôle dans la vision tandis que des interneurons du corps central répondent à plusieurs modalités, souvent de façon différente d'un neurone à l'autre. En cela, ils se rapprochent de ceux du lobe protocérébral. Ces neurones ont des ramifications en éventail, d'où l'autre nom du corps central (corps en éventail). Curieusement, il a été montré chez la drosophile que le complexe central est non seulement impair, mais de plus asymétrique : on y trouve dans la partie droite du cerveau un neuropile sphérique nommé corps asymétrique. Les rares drosophiles qui en sont dépourvues sont incapables de former une MLT, sans que l'on sache pourquoi (Pascual et al., 2004).

La plasticité dans les neurones

Pour connaître les bases neuronales de l'apprentissage chez l'abeille, il faut connaître d'une part les neurotransmetteurs employés par les neurones pour communiquer entre eux, et d'autre part les événements cellulaires impliqués dans la formation de la trace mnésique.

Rôle de l'acétylcholine dans la mise en place de la plasticité neuronale

Les neurotransmetteurs des insectes ont été très étudiés ; Osborne (1996) présente les généralités sur la neurotransmission et détaille les informations disponibles pour différentes espèces, et Bicker (1999) donne des informations approfondies sur l'abeille. Chez l'abeille comme chez les autres insectes, le neurotransmetteur excitateur le plus abondant du système nerveux central est l'**acétylcholine** (Colhoun, 1963). L'acétylcholinestérase (l'enzyme qui dégrade l'acétylcholine), quoique peu présente dans le lobe antennaire, est abondante dans les calices des corps pédonculés et dans le lobe dorsal (Kreissl et Bicker, 1989), et des sites de liaison à l' α -bungarotoxine existent dans le GSO, le lobe α , les glomérules du lobe antennaire et dans le lobe dorsal (Scheidler et al., 1990), ce qui correspond aux sites de liaison d'un anticorps ciblant des récepteurs de l'acétylcholine (Kreissl et Bicker, 1989). De plus, les projections du lobe antennaire vers les corps pédonculés sont cholinergiques chez l'abeille (Oleskevich, 1999) comme chez la drosophile (Yasuyama et al., 2002). L'acétylcholine agit sur deux types de récepteurs : les **récepteurs muscariniques**, qui sont métabotropiques (c'est-à-dire que la fixation de l'acétylcholine entraîne la production de seconds messagers dans la cellule) et les **récepteurs nicotiniques**, qui sont ionotropiques (c'est-à-dire que la fixation de l'acétylcholine entraîne l'ouverture du récepteur -on parle de récepteur canal- ce qui laisse entrer et sortir des ions de la cellule). Les deux types de récepteurs ont été décrits chez l'abeille (Huang et Knowles, 1990).

Les **récepteurs muscariniques** sont impliqués dans les processus de rappel d'une information olfactive apprise en un essai (Gauthier et al., 1994 ; Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et Gauthier, 1998 ; Cano Lozano et al., 2001) : si on bloque leur activité l'abeille devient incapable de récupérer la trace mnésique. L'acquisition n'est pas affectée par leur blocage.

Des récepteurs nicotiniques ont été identifiés dans différentes parties du cerveau de l'abeille. Des enregistrements effectués sur des cellules de Kenyon de nymphe en culture (Goldberg et al., 1999 ; Déglise et al., 2002 ; Wüstenberg et Grünwald, 2004) ou des cellules de lobes antennaires (Barbara et al., 2005) ont indiqué la présence de récepteurs nicotiniques fonctionnels dans ces neurones. Ces résultats indiquent que les récepteurs nicotiniques sont très présents dans les **zones du cerveau impliquées dans l'apprentissage**, ce qui est cohérent avec les effets des antagonistes nicotiniques qui seront rapportés ci dessous. Les cellules de Kenyon de

drosophiles en culture expriment également des récepteurs nicotiniques (Lee et O'Dowd, 1999 ; Su et O'Dowd, 2003). Des détails sur la structure des récepteurs nicotiniques chez les mammifères (qui sont ceux que l'on connaît le mieux et qui ont inspiré les travaux sur ceux des insectes) sont donnés dans l'encadré 4, et ces informations sont résumées dans la figure 7.

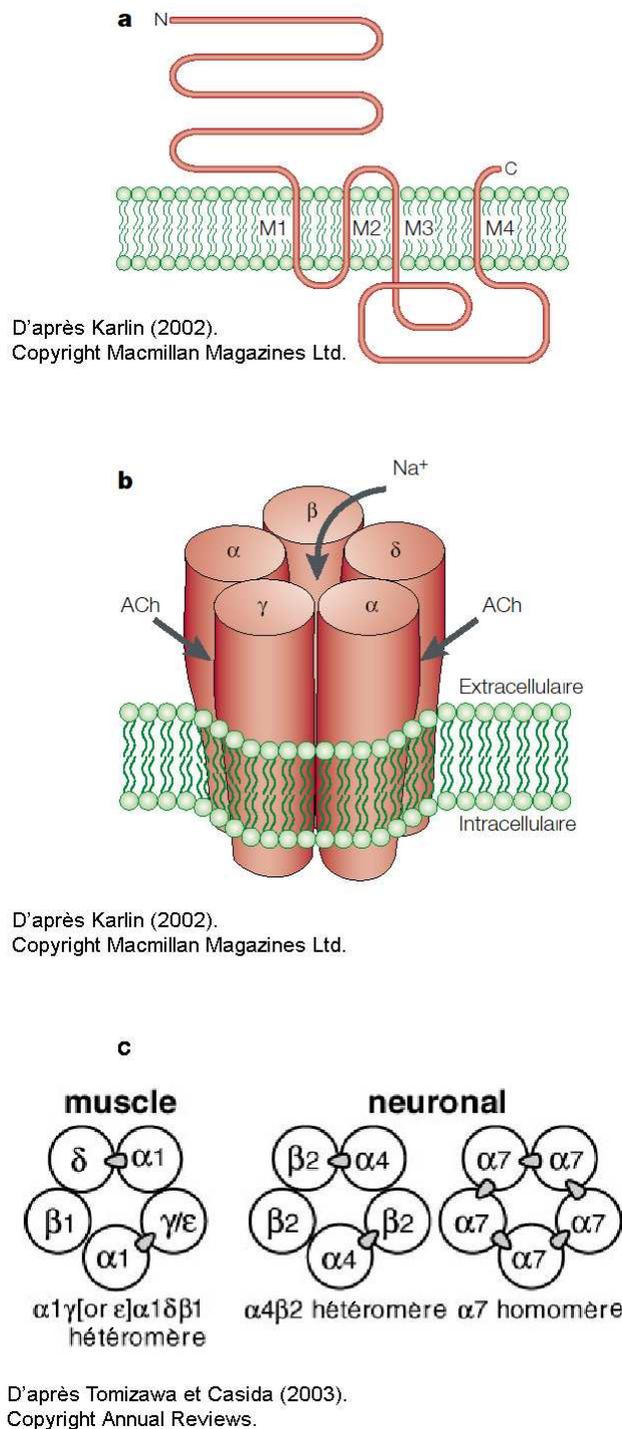


Figure 7 : les récepteurs nicotiniques de Vertébrés. a) schéma d'une sous-unité ; **b)** agencement des cinq sous-unités du récepteur musculaire montrant les sites de fixation de l'acétylcholine (ACh) ; **c)** différents types de récepteurs (musculaire ou neuronaux) comportant différentes sous-unités. Les triangles gris représentent les sites de fixation de l'acétylcholine.

Encadré 4 : les récepteurs nicotiniques de vertébrés

Les **récepteurs nicotiniques** des vertébrés (*figure 7*) ont été très étudiés (Lukas et al., 1999 ; Paterson et Nordberg, 2000 ; Sharples et Wonnacott, 2001 ; Karlin, 2002). Il s'agit de récepteurs ionotropiques, c'est à dire que la liaison du neurotransmetteur (l'acétylcholine) déclenche l'ouverture du récepteur, qui forme alors un canal laissant circuler des ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} à travers la membrane. Ils sont constitués de **cinq sous-unités** transmembranaires. Chacune de ces sous-unités comprend une extrémité N-terminale extracellulaire, quatre domaines transmembranaires (appelés M1, M2, M3 et M4), et une extrémité C-terminale extracellulaire. La zone intra cellulaire située entre M3 et M4 peut être la cible de différentes molécules régulatrices. La zone M2 participe à la formation du canal par lequel passent les ions ; l'intérieur du canal est donc formé par les cinq domaines M2 des sous-unités qui constituent le récepteur.

Les sous-unités peuvent être toutes identiques au sein du récepteur (**récepteurs homomériques**) ; elles peuvent également être différentes (**récepteurs hétéromériques**). Il y a chez les vertébrés 16 types de sous-unités : 9 sous-unités α , 4 sous-unités β , et les sous-unités γ , δ et ϵ . Seules les sous-unités α lient l'acétylcholine, et il y a au moins deux sites de liaisons sur le récepteur, donc au moins deux sous-unités α . De ce fait, les récepteurs homomériques ne sont composés que de sous-unités α ($\alpha 7$, $\alpha 8$, et $\alpha 9$) tandis que les récepteurs hétéromériques incluent deux sous-unités α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ ou $\alpha 6$) et trois sous-unités β ($\beta 2$, $\beta 3$ ou $\beta 4$). Les récepteurs de la jonction nerf-muscle sont constitués de sous-unités spécifiques des récepteurs musculaires : deux $\alpha 1$, $\beta 1$, δ et ϵ (la sous-unité ϵ étant remplacée par la sous-unité γ chez le fœtus). Le site de liaison de l'acétylcholine est situé entre la zone N-terminale et le domaine transmembranaire M1 ; il comprend deux cystéines adjacentes qui distinguent les sous-unités α des autres sous-unités. Plusieurs drogues permettent de distinguer entre différents types de récepteurs : l' α -bungarotoxine bloque les récepteurs musculaires et les récepteurs homomériques, le MLA ne bloque que les récepteurs homomériques $\alpha 7$ tandis que la DHE et la mécamylamine bloquent certains des récepteurs hétéromériques.

Chez les mammifères, l'acétylcholine joue un rôle dans l'apprentissage en modulant l'attention (Granon et al., 1995 ; Levin et Simon, 1998 ; Estape et Steckler, 2002 ; Bentley et al., 2004 ; Parent et Baxter, 2004 ; Wilson et al., 2004 ; Winters et al., 2004) ; un déficit d'acétylcholine est en cause dans la maladie d'Alzheimer (Winkler et al., 1998). Chez les vertébrés, les récepteurs homomériques constitués de sous-unités $\alpha 7$ (et donc sensibles à l' α -bungarotoxine et au MLA) exercent en partie leur activité par l'intermédiaire d'un autre neurotransmetteur, le NO, dont la production est déclenchée par une entrée d'ions Ca^{2+} lors de l'ouverture du canal (Vijayaraghavan et al., 1992 ; Rathouz et al., 1996 ; Smith et al., 1998 ; Adams et al., 2000 ; Shoop et al., 2001 ; Si et Lee, 2001 ; Haberberger et al., 2003).

Plusieurs expériences réalisées sur des cultures de neurones d'abeilles ont indiqué que les **récepteurs nicotiques** de l'abeille peuvent être **bloqués par des antagonistes** (c'est à dire des drogues qui empêchent le fonctionnement du récepteur nicotinique) telles que l' α -bungarotoxine, la dihydro- β - ϵ -*érithroïdine* (DHE), le méthyllycaconitine (MLA) et la mécamylamine (Goldberg et al., 1999 ; Déglise et al., 2002 ; Wüstenberg et Grünwald, 2004 ; Barbara et al., 2005). *In vivo*, il est établi que la mécamylamine bloque l'apprentissage olfactif en un seul essai (Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et al., 2001), sans affecter l'apprentissage en plusieurs essais. Celui-ci est bloqué par l' α -bungarotoxine et le MLA (Gauthier et al., soumis). La nicotine (qui est un agoniste, c'est-à-dire qu'elle active le récepteur) facilite la restitution des informations (Thany et Gauthier, 2005). Ces effets sur l'apprentissage sont associés à des modifications de l'activité des neurones mesurée par le marquage à la cytochrome oxydase (Armengaud et al., 2001). Ces données indiquent que les récepteurs nicotiques sont nécessaires à **la formation de la trace mnésique**. En effet, celle-ci ne peut pas être formée (ou être récupérée) si les récepteurs nicotiques sont bloqués par un antagoniste.

D'autres travaux ont montré que l'activité de l'acétylcholinestérase diminuait lors du conditionnement (Gauthier et al., 1992), mais ce résultat n'a pas pu être confirmé à l'aide d'un protocole plus sensible (Fresquet et al., 1998). L'activité de cette enzyme est plus basse dans les corps pédonculés des butineuses que dans ceux des abeilles qui restent dans la ruche (Shapira et al., 2001), un point important lorsque l'on sait que les butineuses apprennent mieux que les abeilles non butineuses.

En dehors de l'apprentissage chez l'abeille, l'acétylcholine joue un rôle important dans la stridulation chez la sauterelle *Omocestus viridulus* (Ocker et al., 1995 ; Hedwig et Heinrich, 1997 ; Heinrich et al., 1997). L'injection d'acétylcholine dans les zones du protocérébron qui contrôlent ce comportement déclenche la production d'un chant identique à celui que les animaux produisent naturellement et provoque même le chant chez les femelles, qui normalement ne strident pas. Différentes composantes du chant sont contrôlées par les récepteurs muscariniques et nicotiques. L'acétylcholine a le même effet déclencheur sur le chant du grillon *Gryllus bimaculatus* (Wenzel et Hedwig, 1999).

Il a été montré *in vitro* chez la drosophile (Lansdell et Millar, 2000 ; Zhang et al., 2004), le papillon *Manduca sexta* (Fickbohm et Trimmer, 2003), le criquet *Locusta migratoria* (Hermsen et al., 1998) et la blatte *Periplaneta americana* (Buckingham et al., 1997 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Salgado et Saar, 2004) que certains types de récepteurs sont **sensibles à l' α -bungarotoxine et d'autres non**, comme chez le vertébré (voir l'encadré 4 page précédente).

Les récepteurs nicotiniques ont chez l'insecte fait l'objet de nombreuses études visant à définir les **caractéristiques des différentes sous-unités** qui les composent (Thany et al., 2003 ; Jones et al., 2005 ; Sattelle et al., 2005 ; Thany et al., 2005). L'intérêt de ces travaux est de préciser quels sont les récepteurs affectés par les différents antagonistes nicotiniques. En effet, ces drogues permettent de bloquer la formation de la mémoire, mais les effets ne sont pas les mêmes selon les sous-unités composant le récepteur considéré. Aussi, il est important de connaître la composition en sous-unités de chaque récepteur pour déterminer leur rôle potentiel dans l'apprentissage et la mémoire. Les sous-unités des récepteurs nicotiniques de la drosophile ont été complètement séquencées, et bien qu'il n'y en ait que dix dont neuf α et une β (contrairement aux mammifères qui en ont 16), celles-ci peuvent faire l'objet de diverses modifications post-transcriptionnelles comme par exemple l'épissage alternatif (Sattelle et al., 2005), ce qui augmente leur diversité. Ces sous-unités ont également été complètement séquencées chez l'anophèle *Anopheles gambiae* (le moustique vecteur de la malaria) par Jones et al. (2005). Chez l'abeille, le séquençage est également achevé. Son génome comporte 11 sous-unités, neuf α et deux β . Les seules sous-unités publiées sont Apis- α 3 (Thany et al., 2003), Apis- α 2, Apis- α 7-1 et Apis- α 7-2 (Thany et al., 2005) ; les noms de ces sous-unités ont été choisis en fonction de leur homologie avec les sous-unités de vertébrés. Cette diversité dans les sous-unités suggère que chez l'abeille, il pourrait également exister plusieurs sous types de récepteurs nicotiniques, certains sensibles à l' α -bungarotoxine et d'autres qui n'y seraient pas sensibles.

De nombreux insecticides tirent parti du fait que l'affinité des drogues dépend de la composition en sous-unités pour tuer les insectes sans affecter les mammifères (Lansdell et Millar, 2000 ; Tomizawa et Casida, 2001, 2003). En particulier, l'imidaclopride (dont une préparation est le Gaucho™) joue le rôle d'un agoniste nicotinique chez les invertébrés, c'est-à-dire que cette molécule stimule le récepteur nicotinique à la place de l'acétylcholine (Nauen et al., 2001 ; Déglise et al., 2002). De nombreux travaux (Schmuck, 1999 ; Pham-Delègue, 2001 ; Schmuck et al., 2001 ; Armengaud et al., 2002 ; Decourtye et al., 2003 ; Decourtye et al., 2004a ; Decourtye et al., 2004b) ont été consacrés aux effets de l'imidaclopride sur le comportement de l'abeille et sur ses récepteurs nicotiniques. Chez l'abeille, de très faibles doses de cette molécule facilitent l'habituation et diminuent la sensibilité au sucre, et des doses plus élevées sont létales (Guez et al., 2001 ; Lambin et al., 2001 ; Guez et al., 2003).

Les effecteurs de l'acétylcholine

L'acétylcholine joue un rôle dans la plasticité cellulaire via les récepteurs nicotiques ; ceux-ci ont des effets dans la cellule par le biais de seconds messagers. Certains récepteurs nicotiques (sensibles à l' α -bungarotoxine) ont une forte conductance aux ions calcium ; l'entrée de calcium stimule l'enzyme qui produit le **monoxyde d'azote** (NO), la NO-synthase. Ce processus a été décrit chez le criquet *Schistocerca gregaria* par Müller et Bicker (1994), chez l'abeille par Bicker (1996) et par Zayas et al. (2002) chez la chenille du papillon *Manduca sexta*. Il est établi que le blocage de la synthèse de NO empêche la formation de la MLT lors d'un apprentissage olfactif en plusieurs essais (Müller, 1996). La NO-synthase est abondante dans la zone médullaire des glomérules des lobes antennaires et dans les lèvres et l'anneau basal des calices des corps pédonculés, ainsi que dans le lobe α (Müller, 1994). Elle est colocalisée avec les récepteurs nicotiques. Le NO est impliqué dans la perception olfactive (Müller et Hildebrandt, 1995) et joue également un rôle dans l'habituation (Müller et Hildebrandt, 2002).

Le NO étant un gaz, il peut soit rester dans la cellule où il est produit, soit diffuser dans les cellules voisines et agir en leur sein : cette molécule est un neurotransmetteur particulier agissant sans activation d'un récepteur membranaire (Hölscher, 1997 ; Müller, 1997 ; Bicker, 1998, 2001). Il active l'enzyme guanylate cyclase, qui produit du GMP cyclique (Müller, 1994, 1997 ; Bicker, 1998, 2001) ; à son tour, celui-ci active des **protéines kinases** (entre autres la protéine kinase A), qui sont elles aussi impliquées dans la formation de la MLT (Grunbaum et Müller, 1998 ; Fiala et al., 1999). Cependant on ne sait pas quel est le substrat phosphorylé par ces protéines kinases. L'administration dans le lobe antennaire de GMP cyclique ou de protéine kinase lors d'un apprentissage en un essai déclenche la formation de MLT, alors que celle-ci ne se forme normalement qu'au cours d'un apprentissage en plusieurs essais (Müller, 2000). Le NO et les cascades moléculaires situées en aval sont donc **impliqués spécifiquement dans la formation de la MLT** (Müller, 1996).

Le rôle modulateur de l'octopamine et des amines biogènes

L'application de solution sucrée ou d'eau sur une antenne provoque dans le lobe antennaire ipsilatéral une hausse de l'activité de la protéine kinase A, qui est activée par l'AMP cyclique et peut-être le GMP cyclique (Hildebrandt et Müller, 1995b). Injecter cette dernière molécule ou de **l'octopamine** dans le lobe antennaire provoque également une hausse d'activité de la protéine kinase A (Hildebrandt et Müller, 1995a), car l'octopamine provoque une hausse de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique ; comme le lobe

antennaire ne reçoit pas d'afférence gustative de l'antenne, il est probable que ce soit le neurone VUMmx1 qui stimule le lobe antennaire avec de l'octopamine (Hammer et Menzel, 1998). Cette molécule appartient à une catégorie de neurotransmetteurs appelés **amines biogènes** (Blenau et Erber, 1998 ; Blenau et Baumann, 2001), qui à côté de l'acétylcholine jouent un rôle essentiel dans la formation de la trace mnésique. Les amines biogènes ont des effets antagonistes sur le comportement de l'abeille (Erber et al., 1993a). L'octopamine augmente la fréquence des mouvements de l'antenne, tandis que la sérotonine les diminue (Erber et Kloppenburg, 1995 ; Kloppenburg et Erber, 1995 ; Pribbenow et Erber, 1996). De part leurs fonctions modulatrices, les amines biogènes jouent un rôle essentiel dans la mise en place de la plasticité neuronale qui supporte la plasticité des mouvements d'antennes. L'octopamine, neurotransmetteur du neurone VUMmx1, semble être le support de l'information sucrée tandis que l'acétylcholine convoierait l'information liée au stimulus conditionné.

Chez l'abeille, le conditionnement olfactif du REP nécessite de l'octopamine, et la sérotonine (mais pas la dopamine) bloque l'apprentissage (Mercer et Menzel, 1982 ; Menzel et al., 1999 ; Farooqui et al., 2003). La sérotonine et la dopamine bloquent le rappel de la trace mnésique (Mercer et Menzel, 1982 ; Menzel et al., 1999). L'étude du rôle de l'octopamine dans ce phénomène a donné lieu à des résultats complexes. Menzel et al. (1999) ont traité des abeilles à la réserpine, afin de priver le cerveau de toutes les amines biogènes. Ces auteurs ont rapporté que des abeilles recevant de la réserpine et ensuite traitées à l'octopamine étaient incapables de se rappeler du conditionnement, tandis qu'un tel traitement restaure la baisse d'acquisition induite par la réserpine. Par contre, Farooqui et al. (2003) ont observé un blocage du rappel chez des animaux traités avec un antagoniste de l'octopamine ou un ARN interférant bloquant l'expression des récepteurs octopaminergiques. L'octopamine serait donc nécessaire mais pas suffisante lors du rappel.

Enfin, les amines biogènes ont un effet sur la sensibilité au sucre des animaux ; là encore, l'octopamine ou son précurseur la tyramine l'augmentent tandis que la dopamine ou la sérotonine la diminuent (Scheiner et al., 2002). Chez la drosophile, l'apprentissage appétitif nécessite de l'octopamine, tandis que l'apprentissage aversif met en jeu la dopamine (Schwaerzel et al., 2003). Il n'est donc pas surprenant que la protéine kinase A (qui comme on l'a vu est un effecteur de l'octopamine) module également la sensibilité au sucre ; cependant, cette modulation ne joue que sur plusieurs jours (Scheiner et al., 2003b). L'état de satiété des animaux joue également sur l'activité de protéine kinase A : chez des animaux rassasiés (nourris de sucre *ad libitum*) elle n'est pas très élevée. Cet aspect est particulièrement

important pour la formation de la MLT : en effet, des abeilles nourries avant le conditionnement ne sont pas capables de former une trace mnésique (MMT ou MLT) car la protéine kinase A n'est pas très active suite au nourrissage. Ceci explique les mauvaises performances rapportées dans ces conditions par Laffray (2003). Des abeilles nourries dont l'activité de la protéine kinase A est restaurée pharmacologiquement sont capables de former une MLT, quoique leurs performances lors de l'acquisition et de la MMT demeurent faibles (Friedrich et al., 2004).

Synthèse de ces données et questions actuelles

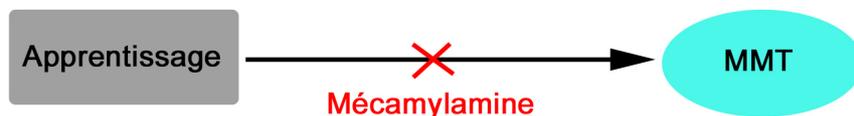
Selon les données discutées précédemment, la stimulation des neurones du lobe antennaire par l'octopamine provenant du VUMmx1 aboutirait à la production d'AMP cyclique, qui stimulerait la protéine kinase A ; celle-ci serait également stimulée par le GMP cyclique, qui serait produit suite à la libération de NO. La protéine kinase A serait ensuite impliquée dans le déclenchement d'événements sous-tendant la formation de la MLT. Un résumé des mécanismes cellulaires de la formation de la mémoire est présenté *figure 8*.

On ne sait toutefois pas comment l'information sur l'odeur peut être associée à l'information sur le sucre véhiculée par l'octopamine, ni ce qui provoque l'apport de calcium provoquant la libération du NO, ni même pourquoi cette production de NO n'intervient que lors de l'apprentissage en plusieurs essais.

Les mécanismes neuronaux de la mémoire chez l'abeille sont donc encore très étudiés. Plusieurs grandes questions restent ouvertes :

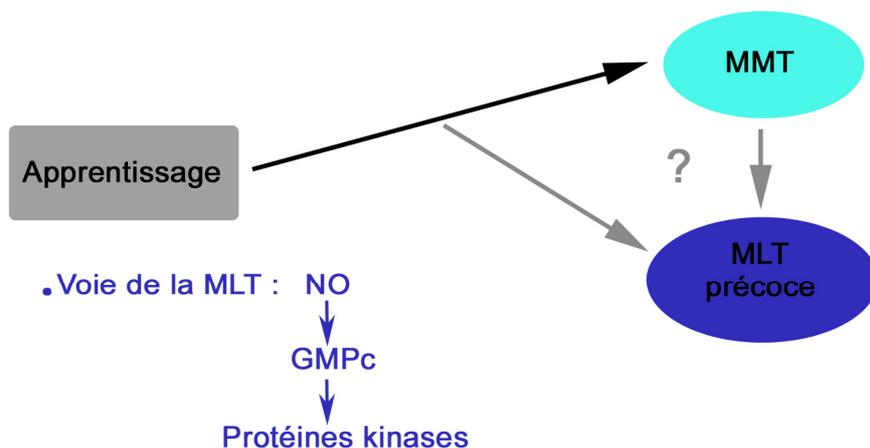
- Sur la nature de l'association qui se fait : l'abeille forme-t-elle une association entre l'odeur apprise et le PER, ou entre l'odeur apprise et le sucre ?
- En admettant une convergence entre les différents stimuli (odeur et sucre), comment et où les informations correspondantes sont-elles associées dans le cerveau de l'abeille ?
- Par extension, quel est le support de la trace mnésique ? Quelles parties du cerveau sont impliquées dans les processus d'acquisition, de consolidation et de rappel ?
- Enfin, même si plusieurs travaux ont été menés dans cette direction, on ne sait pas quel est le support de la plasticité synaptique chez l'abeille ; s'agit-il d'une plasticité pré-synaptique, post-synaptique ou met-elle en jeu des événements dans les deux neurones ?

Apprentissage en un essai



L'octopamine et la tyramine augmentent la performance ;
la sérotonine et la dopamine la diminue.
L'octopamine active la protéine kinase A.

Apprentissage en plusieurs essais



•Apprentissage distribué : synthèse de protéines (MLT tardive)

L'octopamine et la tyramine augmentent la performance ;
la sérotonine et la dopamine la diminue.
L'octopamine active la protéine kinase A.

Figure 8. Le support moléculaire de la mémoire chez l'abeille. Pour l'apprentissage en un essai, des récepteurs nicotiques sensibles à la mécamylamine sont nécessaires. Pour l'apprentissage en plusieurs essais, une cascade moléculaire impliquant le NO, le GMP cyclique et des protéines kinases est mise en jeu. Lors d'un apprentissage en plusieurs essais distribués, il se forme en plus une MLT tardive nécessitant une synthèse de protéines. On ne sait pas si la MLT apparaît indépendamment ou non de la MMT. Enfin, les **amines biogènes** modulent la performance en affectant la sensibilité au sucre, et l'octopamine active la protéine kinase A.

Objectifs de ce travail

Les grandes questions qui viennent d'être présentées couvrent des domaines très vastes ; ce travail porte sur un point très précis. En effet, le rôle des neurotransmetteurs dans la plasticité neuronale n'a pas été très approfondi. La fonction des amines biogènes est bien décrite, mais celles-ci ne jouent qu'un rôle modulateur en apportant l'information sur la récompense (le sucre). Les rôles de l'acétylcholine (Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et al., 2001 ; Gauthier et al., soumis) et du NO (Müller, 1996) ont été abordés, mais rien ne prouve que ces neurotransmetteurs jouent un rôle dans toutes les formes de mémoires chez l'abeille : leur rôle pourrait être limité à la mémoire olfactive. On ignore de plus le rôle des récepteurs nicotiques dans l'apprentissage en plusieurs essais.

Les objectifs des travaux présentés ici sont donc de déterminer :

- 1. le rôle des récepteurs nicotiques,**
- 2. le rôle de la synthèse de NO,**

dans l'apprentissage mécanosensoriel, afin de vérifier si les observations faites avec le conditionnement olfactif peuvent être généralisées à d'autres modalités sensorielles.

Pour cela, des antagonistes nicotiques seront injectés avant le rappel ou l'apprentissage de la tâche afin de bloquer les récepteurs nicotiques ; on observera ensuite si les animaux traités ont des performances différentes de celles des animaux témoins. La performance est en l'occurrence mesurée par la fréquence des REP conditionnés au sein de chaque groupe. De la même façon, le rôle de la synthèse de NO peut être étudié selon le même protocole en administrant un inhibiteur de la NO-synthase aux animaux pour déterminer si cette enzyme est impliquée dans l'apprentissage mécanosensoriel. Les expériences seront faites avec des conditionnements en un ou en plusieurs essais (massés, car la durée d'effet des drogues utilisées ne permet pas de travailler avec un protocole distribué), afin de pouvoir étudier tant la MMT que la MLT (MLT précoce, car il s'agira d'apprentissage massé). Les injections seront faites dans l'hémolymphe des animaux et pourront donc affecter l'ensemble du cerveau ; des injections locales n'ont pas été réalisées dans le cadre de cette étude. En effet, l'objectif de ce travail est de préciser le rôle des récepteurs nicotiques et de la NO synthase dans différentes formes de mémoire, sans présumer de la zone exacte du cerveau mise en jeu. Des injections localisées dans des zones précises du cerveau pourront être réalisées ultérieurement ; ce type de technique étant plus délicat à mettre en œuvre, de tels travaux seront guidés par les résultats rapportés ici.

Par ailleurs, comme l'apprentissage mécanosensoriel a été moins étudié que l'apprentissage olfactif, certaines de ses caractéristiques comportementales (différence entre les apprentissages massé et distribué, effet Kamin ...) seront étudiées au préalable.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les animaux

Prélèvement

Il s'agit d'abeilles ouvrières *Apis mellifera* obtenues au rucher du laboratoire. En hiver, celui-ci est chauffé et les abeilles sont nourries avec un mélange d'eau et de miel : dans ces conditions, elles n'entrent pas en léthargie pendant la mauvaise saison. Le prélèvement des abeilles s'effectuait en plaçant une petite cagette de plastique sur une trappe ouverte située au sommet de la ruche : des abeilles rentraient alors dans la cagette.

Cette technique de prélèvement permet d'obtenir des abeilles dans les mêmes conditions quelque soit la saison, mais a l'inconvénient de fournir des abeilles d'âges différents, ce qui peut influencer leur performance au cours de l'apprentissage. Au cours de chaque expérience et pour chaque prélèvement, un groupe contrôle (voir ci dessous) était formé et les abeilles étaient réparties équitablement dans chaque groupe (contrôle ou traité), de sorte que le facteur « âge des animaux » était maintenu constant d'un groupe à l'autre.

Fixation

Une fois ramenée au laboratoire, la cagette était placée dans de la glace jusqu'à la cessation complète des mouvements des abeilles. Chacune d'entre elles était ensuite placée dans un petit tube de plastique et fixée en déposant sur le thorax, l'arrière de la tête et le tube une goutte d'un mélange fondu de cire et de colophane (respectivement 9g et 4g, soit 69% et 31%). Les abeilles étaient manipulées à l'aide de pinces souples spécialement adaptées aux insectes. Les pattes antérieures étaient également fixées : de cette façon, l'animal ne pouvait bouger que ses antennes et son proboscis. Une goutte de sucre (solution de saccharose à 1,17 M) était ensuite donnée aux abeilles avant de les faire jeûner toute la nuit. Les animaux employés pour les expériences de conditionnement mécanosensoriel ou l'enregistrement des mouvements d'antennes avaient de plus leurs yeux recouverts avec de la peinture acrylique noire diluée à l'eau. Cette précaution était prise pour s'assurer qu'ils n'utilisent pas des informations visuelles telles que l'approche de la plaque avec laquelle on les conditionne.

Les drogues

Opération et injection

Avant le début des expériences, les abeilles étaient opérées ; cette **opération avait toujours lieu au moins 1 heure** avant le début des expériences et permettait d'injecter les produits à tester aux abeilles. On l'effectue en coupant à l'aide d'un microscalpel l'ocelle médian de l'abeille et une petite partie de la cuticule adjacente (après avoir retirée la cire qui les recouvre éventuellement).

L'injection était effectuée à l'aide d'une microseringue de 1 μl (modèle Microliter 7001, fournisseur : Hamilton, Bonaduz, Suisse) dont la pointe était insérée dans l'ouverture pratiquée au niveau de l'ocelle lors de l'opération. **Les solutions étaient injectées dans l'hémolymphe du cerveau.** Celle-ci arrive au sommet de la tête (c'est-à-dire là où on pratique l'injection), avant d'irriguer le cerveau et de repartir dans le reste du corps (Winston, 1987). L'injection faite à cet endroit affecte donc l'ensemble du cerveau. Au cours d'une expérience, on employait une seringue pour chaque produit et celle-ci était nettoyée à l'éthanol pur après l'expérience.

Selon l'expérience et le produit injecté, le **volume injecté était de 0,3 ou 0,5 μl** (à titre de comparaison, le volume d'une abeille est de l'ordre de 125 μl). Le volume utilisé sera précisé pour chaque expérience. Lors des expériences d'apprentissage, il était constant pour chaque drogue si bien que la quantité de produit était la même dans tous les cas.

Produits utilisés

Tous les produits chimiques ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les produits injectés étaient conservés dans de la glace pendant toute la durée des expériences. Les solutions mères étaient conservées à -20°C .

Les drogues employées étaient des antagonistes nicotiques :

- le **MLA** (méthyllycaconitine, concentration 2, 5 ou 10 μM),
- la **DHE** (Dihydroxy- β -érithroïdine, 1, 5 ou 10 mM),
- la **mécamylamine** (10 ou 50 mM), et
- l' **α -bungarotoxine** (1 à 100 μM).

Ces quatre drogues ont été choisies pour leurs propriétés : des expériences de patch clamp ont indiqué que toutes sont des antagonistes nicotiques *in vitro* pour les cellules de nymphe d'abeille en culture (Goldberg et al., 1999 ; Déglise et al., 2002 ; Wüstenberg et Grünewald, 2004 ; Barbara et al., 2005). De plus, chez le vertébré, ces drogues permettent de

distinguer entre les récepteurs nicotiniques sensibles à l' α -bungarotoxine avec cette drogue et le MLA, et, avec la mécamylamine et la DHE, ceux qui n'y sont pas sensibles (Sharples et Wonnacott, 2001).

Pour étudier le rôle du NO, on a également employé un **inhibiteur de la NO-synthase** (l'enzyme qui produit le NO dans la cellule), le **L-NAME** (N ω -nitro-L-arginine-méthyl-ester, 200 μ M), et son énantiomère inactif le D-NAME (N ω -nitro-D-arginine-méthyl-ester, même concentration).

Toutes les drogues étaient dissoutes dans une **solution saline** adaptée aux abeilles (composition : 0,2 g de KCl, 9,0 g de NaCl, 0,2 g de CaCl₂, 4,0 g de saccharose, 11,43 g de Na₂HPO₄ et 2,22 g de NaH₂PO₄ dans 1 litre d'eau distillée ; 605,9 mosmol.l⁻¹). Cette solution saline était également injectée dans les groupes contrôles pour prendre en compte les effets de l'injection elle-même, sauf pour le L-NAME où une solution saline contenant l'énantiomère inactif (le D-NAME), était employée à cette fin. Il a été vérifié par Müller (1996) que les effets d'une injection de D-NAME ou de solution saline étaient identiques.

Protocole des expériences

Cette section présente de façon générale le protocole des expériences réalisées. Les détails spécifiques à chaque expérience seront donnés dans la partie résultats.

Nécessité d'expériences contrôles préliminaires

On a vu que l'acétylcholine était très abondante dans le cerveau des insectes. Comme il s'agit du principal neurotransmetteur excitateur de l'abeille, interférer avec les voies cholinergiques pourrait mener à des effets non spécifiques, comme par exemple un blocage de la perception. Un tel effet non spécifique mènerait à une disparition du REP conditionné et pourrait être confondu avec un blocage de la mémoire (Cahill et al., 2001 ; Thorpe et al., 2004). En fait, un effet des drogues nicotiniques sur la performance des animaux pourrait être interprété de différentes façons n'impliquant pas un rôle des récepteurs nicotiniques dans la mémoire :

1. la drogue bloque la perception du sucre, dans ce cas l'animal n'apprend rien et l'on n'observe jamais de REP (conditionné ou non).
2. la drogue bloque le REP lui-même, dans ce cas il est impossible de savoir si l'animal apprend ou pas car la drogue l'empêche de toute façon de répondre et là encore on n'observe jamais de REP.

3. la drogue affecte la sensibilité au sucre, par exemple en diminuant la motivation de l'animal à effectuer un REP lorsque son antenne est stimulée par le sucre. Comme dans ce cas la valeur renforçatrice du sucre est diminuée, la performance mnésique l'est également sans impliquer pour autant que les drogues nicotiques jouent un rôle dans la mémoire. La diminution de la performance lors de l'apprentissage suite à une baisse de la sensibilité au sucre a été discutée par Scheiner et al. (2004).
4. la drogue bloque la perception du stimulus conditionné, c'est-à-dire la plaque métallique. Là encore, l'animal est incapable d'apprendre quoique ce soit sans pour autant qu'un déficit mnésique en soit la cause.
5. la drogue affecte d'autres récepteurs que les récepteurs nicotiques. Dans ce cas, même si ses effets affectent spécifiquement la mémoire, on ne peut pas conclure pour autant que les voies cholinergiques sont impliquées dans la mémoire.

Il est donc crucial de s'assurer qu'aucune de ces interprétations n'est possible avant de conclure à un effet des drogues nicotiques sur la mémoire. Pour cela, plusieurs expériences contrôles seront faites. Ainsi, en déterminant les concentrations de drogue pour lesquelles l'animal devient moins sensible au sucre (point 3) ou cesse d'y répondre (points 1 et 2), il sera possible d'évaluer **les doses de drogue à ne pas dépasser pour ne pas affecter les réactions de l'abeille vis-à-vis du sucre**. Il est d'autant plus important de s'assurer de l'absence de ce problème que les voies cholinergiques semblent être impliquées dans la perception du sucre (Braun et Bicker, 1992 ; Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano, 1997 ; Thany et al., 2005).

Le problème décrit au point 4 ne se manifestera que si une drogue bloque systématiquement la performance des animaux. Si au cours d'un protocole une drogue bloque l'apprentissage mais qu'elle ne le bloque pas dans d'autres conditions, alors on peut exclure que cette drogue bloque la perception du stimulus conditionné ; en effet, un tel blocage serait observé quel que soit le protocole. Pour contrôler encore plus ce point pour l'apprentissage mécanosensoriel, les **conséquences d'une injection de drogue sur les mouvements d'antennes seront évaluées**. La perception olfactive n'est quant à elle pas affectée par les drogues nicotiques (Cano Lozano et al., 1996).

Le biais décrit au point 5 est plus difficile à contrôler. Cependant, les propriétés des drogues utilisées ont été décrites *in vitro* dans des cultures de neurones d'abeilles (Goldberg et al., 1999 ; Déglise et al., 2002 ; Wüstenberg et Grünwald, 2004 ; Barbara et al., 2005) ainsi que chez le grillon *Acheta domesticus* (Cayre et al., 1999). En outre, les résultats précédemment publiés et

ceux rapportés ici ont été obtenus à l'aide de diverses drogues nicotiniques qui ont donné des résultats cohérents. Comme il est difficilement envisageable que des drogues qui *in vitro* sont toutes des antagonistes nicotiniques et dont les structures chimiques sont diversifiées aient toutes une affinité pour des récepteurs non nicotiniques, on a admis que les résultats observés sont spécifiques des voies nicotiniques.

Mesure de la sensibilité au sucre

Ces expériences ont été initiées au cours d'un séjour dans le laboratoire du Professeur Erber à la Technische Universität de Berlin, puis poursuivies à Toulouse. Leur but était d'évaluer l'effet des drogues sur la sensibilité au sucre. Pour cela, on présente deux fois une série de solutions de saccharose dont la concentration croît de façon exponentielle : 0% (eau pure), 0,1%, 0,3%, 1%, 3%, 10%, 30% (ces pourcentages s'entendent masse/volume, c'est-à-dire 10% = 1 g pour 10 ml = 0,29 M). La présentation des différentes solutions se fait dans l'ordre croissant des concentrations. Pour chaque concentration, les deux antennes étaient touchées par une goutte de solution, et on observait si l'animal a un REP ou non ; on compte le nombre de REP effectués au cours de la présentation de la gamme de solution. Les animaux n'étaient pas nourris avec la solution et il y avait un délai de 2 minutes entre la présentation de chaque concentration pour éviter un phénomène d'habituation de l'animal ou de désensibilisation de ses sensilles antennaires. Dix minutes après la première présentation de toute la gamme, les animaux recevaient une injection de solution saline ou de drogue (DHE, mécamylamine, MLA ou α -bungarotoxine, volume 0,5 μ l, voir résultats pour les concentrations). Ensuite, 10 à 20 minutes après l'injection, toute la gamme des concentrations de sucre étaient présentée dans le même ordre. Les animaux qui répondaient à l'eau lors de la toute première présentation ou qui lors de la présentation des deux gammes n'avaient aucun REP pour aucune des solutions sucrées n'ont pas été pris en compte. On s'assure de la sorte qu'on ne conserve que les animaux qui réagissent au sucre mais pas à l'eau.

Pour mesurer l'effet de l'injection sur la sensibilité au sucre, un indice de modulation (IM) a été calculé pour chaque individu :

$$IM = \frac{POST - PRE}{POST + PRE}$$

où PRE est le nombre de REP lors de la première présentation (avant l'injection), et POST le nombre de REP lors de la seconde présentation (après l'injection). Cet IM a été employé par Scheiner et al. (2002) pour mesurer la variation de la sensibilité au sucre suite à des traitements pharmacologiques. En effet, le décompte du nombre de REP lors de la présentation de la gamme de concentration est corrélé avec la performance des abeilles lors de l'apprentissage et la division

du travail au sein de la ruche (Page et Erber, 2002 ; Scheiner et al., 2004). L'IM varie de -1 (individu qui cesse de répondre suite à l'injection) à +1 (cas inverse) ; une valeur positive indique une croissance de la sensibilité au sucre entre la présentation des deux gammes tandis qu'une valeur négative indique une baisse de cette sensibilité ; si $IM = 0$, alors la performance de l'animal n'a pas varié. Comme les animaux qui répondaient spontanément à l'eau lors de la première présentation n'étaient pas conservés, PRE variait de 0 à 6 et POST de 0 à 7. Dans ces conditions, l'IM peut refléter une hausse de sensibilité des animaux même pour ceux qui étaient les plus sensibles lors du premier passage (passage de 6 à 7). De même, on peut détecter de la sorte une diminution pour ceux qui étaient les moins sensibles (passage de 1 à 0), car on ne garde pas les animaux faisant 0 puis 0 REP. D'autre part, on a pour cette raison $POST + PRE > 0$ donc l'IM est toujours défini.

Pour évaluer l'effet des injections, on compare non seulement les IM entre les groupes, mais aussi la proportion d'animaux répondant à la plus haute concentration (30%) après l'injection.

Enregistrement des mouvements d'antennes

L'objectif de ces expériences est d'étudier les effets de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine sur les mouvements de l'antenne. Ces travaux ont été conduits au cours d'un séjour dans le laboratoire du Professeur Erber à la Technische Universität de Berlin. Ils consistaient à compter le nombre de contacts antennaires par période de 10 secondes (CA10s) sur une petite plaque de métal (3 mm de large, non gravée). Un premier enregistrement était réalisé pendant 10 minutes, soit 60 périodes de 10 secondes. On calculait ensuite le CA10s moyen pour cette période de 10 minutes à partir des 60 valeurs. La drogue (α -bungarotoxine 1 μ M ou mécamylamine 10 mM, volume 0,3 μ l) ou la solution saline était ensuite injectée. Immédiatement après, le CA10s moyen était de nouveau mesuré pendant deux périodes de 10 minutes consécutives. On a donc une mesure de la mobilité antennaire (CA10s moyen pendant 10 minutes) avant l'injection et deux mesures consécutives après celle-ci, ce qui permet de détecter l'effet éventuel de la mécamylamine ou de l' α -bungarotoxine.

Pour mesurer le CA10s, on plaçait l'abeille dans une enceinte fermée dont l'atmosphère était maintenue humide (pour un bon contact électrique) par la présence d'un tampon imbibé d'eau. L'animal était relié à la masse du circuit par le truchement d'un fil métallique planté dans son œil, et la plaque métallique était placée à portée de l'antenne droite ; l'ensemble du dispositif était situé dans une cage de Faraday pour diminuer le bruit lors des enregistrements. La plaque métallique était reliée à un amplificateur L/M S22 (List Medical, Darmstadt, Allemagne) et le

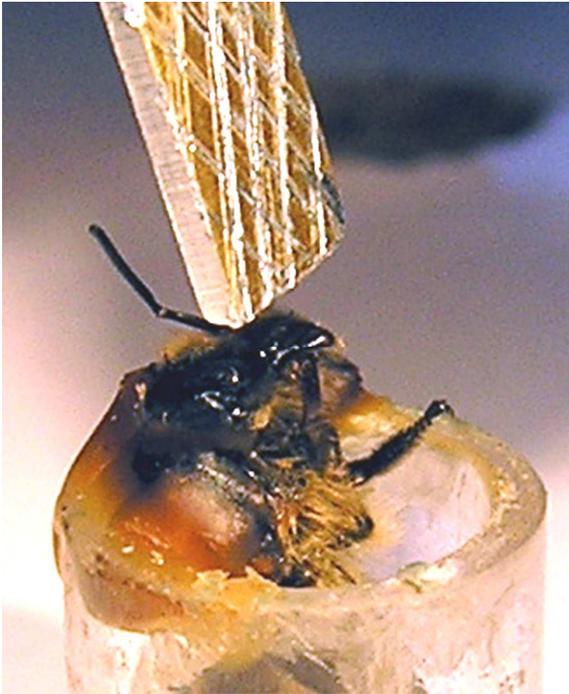
circuit était complété par un oscilloscope qui permettait de contrôler le signal enregistré. A chaque fois que l'abeille touchait la plaque de son antenne, le circuit se fermait et un bref signal était enregistré sur un ordinateur par l'intermédiaire d'une carte d'interface 1401 (CED, Cambridge, Angleterre). Le signal était séparé du bruit de fond électrique par un filtre qui, en fixant comme valeur minimale à partir de laquelle le signal est enregistré une valeur supérieure au bruit de fond, permettait d'ignorer celui-ci. L'ordinateur calculait ensuite à l'aide du logiciel Spike 2 (CED, Cambridge, Angleterre) le nombre de contacts enregistrés pour chaque période de 10 secondes, c'est-à-dire le CA10s. La moyenne des 60 valeurs de CA10s était ensuite calculée après 10 minutes d'enregistrement. Cette technique est une adaptation de celle utilisée par Kisch et Erber (1999) pour réaliser un conditionnement opérant des mouvements d'antennes.

Faute d'avoir eu suffisamment de temps lors de mon séjour à Berlin, seule l'antenne droite a été testée ; mais comme l'injection était réalisée globalement et que des différences dans la motricité des antennes droite et gauche n'ont jamais été observées par le passé, il serait extrêmement surprenant qu'un traitement n'affectant pas les mouvements de l'antenne droite affecte ceux de l'antenne gauche.

Apprentissage mécanosensoriel

Lors d'un essai d'apprentissage du conditionnement mécanosensoriel, une petite plaque métallique (largeur 5 mm) munie de gravures verticales était placée à portée des antennes de l'abeille durant 5 secondes avant d'être éloignée. Tant que cette plaque était présente, l'abeille la touchait par des mouvements rapides et brefs de la pointe de ses antennes. Après 2 secondes de présentation de la plaque (sur 5 secondes), une goutte de solution de saccharose (1,17 M) était placée sous le proboscis de l'abeille en soulevant délicatement ce dernier, ce qui provoquait un REP. L'animal était ensuite autorisé à boire le sucre jusqu'à 2 secondes après qu'on ait enlevé la plaque (soit une présentation contiguë des deux stimuli pendant 3 secondes, le sucre étant présenté au total 5 secondes). L'ensemble de la procédure est illustrée *figure 9*.

Toute abeille qui ne se mettait pas à toucher la plaque avec ses antennes lorsqu'on l'approchait à portée de ses antennes, qui répondait spontanément par un REP à la présentation initiale de la plaque (ce qui était rare) ou qui n'avait pas de REP induit par le sucre n'était pas utilisée dans l'expérience. Ces précautions assuraient que l'abeille détectait effectivement la plaque métallique, qu'elle était initialement neutre pour elle et qu'elle était capable d'avoir un REP en réponse au sucre. Enfin, avant et après chaque présentation de la plaque, celle-ci était trempée dans de l'éthanol et séchée avec du papier absorbant pour s'assurer qu'il ne restait pas d'éthanol. Cette précaution était prise pour s'assurer de la propreté de la plaque et de l'absence de tout marquage olfactif.



A : On présente pendant 5 secondes une plaque métallique rayée à l'abeille, qui se met à la toucher avec la pointe de ses antennes. Elle n'a initialement pas de REP. Le dos de la plaque comporte également des rayures en diagonale ; elles n'ont pas été utilisées dans les expériences rapportées ici.

B : Après 2 secondes, on présente au niveau du proboscis une goutte de solution sucrée pendant 5 secondes, ce qui provoque le REP ; l'abeille boit le sucre.



C : Lors du test de rappel, une abeille conditionnée tend son proboscis pour la plaque seule.

Figure 9 : Le conditionnement mécanosensoriel

Les tests de rappel étaient réalisés en présentant la plaque pendant 5 secondes sans la récompense sucrée. Le délai entre l'apprentissage et ces rappels sera précisé pour chaque expérience. Un REP était enregistré comme une réponse positive. Si la présentation de la plaque ne déclenchait pas de REP, une goutte de sucre était présentée à l'abeille une minute après (pour éviter une nouvelle association entre la plaque et le sucre). Si cette goutte de sucre déclenchait le REP, alors une réponse négative était enregistrée ; si par contre l'animal n'avait de REP ni pour la plaque ni pour le sucre, alors sa performance n'était pas prise en compte.

L'apprentissage mécanosensoriel n'ayant pas été très étudié, une expérience pilote a consisté à déterminer les courbes d'apprentissage des animaux et à rechercher un éventuel effet Kamin (Kamin, 1957). Pour les expériences impliquant un apprentissage en plusieurs essais, l'intervalle entre les essais était de 1 minute, les expériences préliminaires rapportées dans les résultats assurant que cet intervalle n'amoindrit pas la performance des animaux par rapport à un apprentissage réalisé avec des délais plus longs. Cet intervalle a donc été choisi pour s'assurer que tout l'apprentissage se déroule durant la durée d'activité des drogues utilisées. Toutefois, rien ne prouve que les traces mnésiques formées lors d'apprentissages en plusieurs essais massés ou distribués soient les mêmes (il pourrait s'agir respectivement de MLT précoce ou tardive). Aussi, le texte se référera à la MLT (sans plus de précision) par commodité, mais il s'agira plutôt de MLT précoce (c'est-à-dire que les résultats obtenus avec l'apprentissage en plusieurs essais massés ne seraient pas forcément les mêmes si on avait pu utiliser un apprentissage en plusieurs essais distribués).

Pour étudier le rôle des récepteurs nicotiques dans l'apprentissage et la mémoire mécanosensoriel, les drogues présentées précédemment ont été injectées aux animaux soit avant l'apprentissage (pour affecter l'acquisition) ou avant le test (pour affecter le processus de rappel). Le détail des injections réalisées sera donné pour chaque expérience.

Les premières expériences réalisées sur l'apprentissage mécanosensoriel ont été faites avec l' α -bungarotoxine et la mécamylamine. Par la suite, lors des expériences impliquant le MLA, la DHE, la mécamylamine et le L-NAME, le protocole a été simplifié sans pour autant changer sa pertinence. Ainsi, le nombre d'essais dans l'apprentissage en plusieurs essais est passé de cinq à trois, et les injections faites avant le rappel n'étaient plus précédées d'un premier rappel (voir la partie résultat pour les détails). Dans tous les cas, le mode opératoire exact sera précisé dans chaque expérience.

Traitement des données

Tous les tests statistiques employés étaient bilatéraux, et le risque α était fixé à 0,050. Ces tests ont été effectués avec les logiciels R 2.0 (R Development Core Team, 2004) ou SPSS 12.0 (SPSS Science, Chicago, USA). **Dans toutes les figures présentées dans les résultats, les nombres entre parenthèses ou sous l'axe des abscisses sont les nombres d'abeilles employées dans chaque groupe.**

Mouvements d'antennes

Les moyennes des CA10s dans chaque groupe ont été comparées à l'aide d'une ANOVA à 1 facteur avec mesures répétées effectuée avec SPSS. Le facteur était la drogue utilisée (mécamylamine, α -bungarotoxine ou solution saline), et les mesures répétées les valeurs successives des CA10s moyens après l'injection (0 à 10 min après et 10 à 20 min après). Ces mesures étaient normalisées en les divisant par la valeur du CA10s avant l'injection ; les moyennes des CA10s avant l'injection n'étaient pas différentes d'un groupe à l'autre (ANOVA sur les données transformées par les logarithmes, $F_{2,27} = 0,523$, $p = 0,598$), cette normalisation place donc les groupes au même niveau de référence. Le graphique représente la moyenne (avec erreur standard) des CA10s normalisés.

Sensibilité au sucre

L'IM obtenu pour chaque concentration des drogues a été comparé à celui du groupe contrôle correspondant. Comme ces données ne sont pas distribuées d'une façon normale, on a employé à l'aide de SPSS le test de Mann et Whitney pour les comparer. En outre, avant de calculer les IM, on s'est assuré que les performances avant l'injection ne différaient pas significativement d'un groupe à l'autre, ce qui était toujours le cas (test de Mann et Whitney, $p > 0,050$). Les IM mesurent donc les variations de performance d'animaux qui partent du même niveau moyen. Les figures correspondantes montrent la médiane et l'intervalle interquartile de l'IM de chaque groupe et **les étoiles mettent en évidence les différences statistiquement significatives entre les indices de modulation** (test de Mann et Whitney) selon le code suivant : * : $p < 0,050$; ** : $p < 0,010$; *** : $p < 0,001$. Les groupes intitulés « Saline » correspondent aux groupes contrôles injectés avec de la solution saline.

De plus, les proportions d'animaux dans les groupes contrôle et traité répondant après l'injection à la concentration de sucre la plus élevée (30 %) étaient comparées. Pour cela, on a employé à l'aide de SPSS le test exact de Fisher (les conditions d'usage du χ^2 -effectifs calculés supérieurs à ou égaux à 5- n'étaient pas toujours réunies). Cette information est

donnée dans les figures : **les croix indiquent les différences dans le taux de REP pour la solution de sucre la plus concentrée** (test exact de Fisher) : + : $p < 0,050$; ++ : $p < 0,010$; +++ : $p < 0,001$.

Apprentissages mécanosensoriel

Au cours de ces expériences, on a évalué la performance des animaux au cours de l'expérience par la proportion d'animaux dans chaque groupe qui avaient un REP. Cette valeur est appelée « taux de REP » dans les figures et les étoiles mettent en évidence les différences statistiquement significatives selon le code suivant : * : $p < 0,050$; ** : $p < 0,010$; *** : $p < 0,001$. Les groupes intitulés « Saline » correspondent aux groupes contrôles injectés avec de la solution saline. Aucune barre d'erreur n'est représentée, car les barres d'erreur des proportions (écarts types, erreurs standards ou intervalles de confiance) ne dépendent que de l'effectif et de la proportion elle-même ; la précision de la mesure ne dépend donc que du nombre d'abeilles utilisé. Pour comparer la performance des animaux dans chaque groupe, on a employé à l'aide de R le test exact de Fisher car les conditions d'usage du χ^2 (effectifs calculés supérieurs à 5) n'étaient pas systématiquement réunies. Lorsque c'était approprié, R a utilisé un algorithme permettant d'utiliser le test exact de Fisher pour plus de 2 groupes.

Des tests appariés (test de Cochran ou test de McNemar) n'ont pas été employés, car de tels tests ne peuvent pas être directement utilisés pour vérifier si la performance mnésique des animaux évolue avant et après l'injection. En effet, Rescorla (1988a) a indiqué que la variation de la performance des animaux au cours du temps ne correspond pas forcément à la variation de la mémoire, car la performance des animaux n'est pas forcément représentative de leur mémoire (Cahill et al., 2001 ; Thorpe et al., 2004). Bien sûr, on pourrait utiliser un test pour le groupe témoin et un test pour chaque groupe traité (2 comparaisons intra-groupes), et ensuite comparer les résultats des tests ; toutefois, la multiplication des tests (appariés ou non) alourdit voire obscurcit l'interprétation des résultats et augmente la possibilité d'obtenir une erreur statistique de première espèce (considérer significative une différence due au hasard). De ce fait, seul le test exact de Fisher a été utilisé (comparaison inter-groupes).

Lorsqu'il y avait une différence significative entre trois groupes et que cette différence ne s'expliquait pas de façon évidente au vu des figures correspondantes, des tests supplémentaires étaient réalisés en comparant les groupes deux à deux. Dans ces conditions, ces tests n'étant pas indépendants les uns des autres, les probabilités obtenues étaient ajustées par la méthode de Holm que fournit la fonction « p.adjust » de R.

RÉSULTATS

1) EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES

L'objectif des travaux rapportés dans cette section était d'effectuer un certain nombre de contrôles préliminaires sur l'effet des drogues sur les mouvements d'antennes et sur la sensibilité au sucre.

1.1) Effet des drogues sur les mouvements d'antennes

Au cours de cette expérience, la fréquence des mouvements d'antenne (évaluée par le CA10s) était enregistrée pendant 10 minutes. Ensuite, les abeilles recevaient une injection (0,3 µl) de solution saline, d'α-bungarotoxine (1 µM) ou de mécamylamine (10 mM), puis les CA10s étaient enregistrés de nouveau pendant deux périodes consécutives de 10 minutes. Les valeurs obtenues ont été normalisées en les divisant par la valeur du CA10s avant l'injection. Comme on le voit sur la *figure 10*, l'injection d'α-bungarotoxine ou de mécamylamine n'induit pas d'effet statistiquement significatif sur le CA10s au cours des deux périodes de dix minutes qui suivaient l'injection (ANOVA, facteur drogue : $F_{2, 27} = 0,020$, $p = 0,980$; interaction drogue/temps : $F_{2, 27} = 0,725$, $p = 0,493$). Au sein de chacun des groupes, il n'y avait pas de différence entre les performances mesurées de 0 à 10 minutes ou de 10 à 20 minutes (ANOVA, facteur temps : $F_{1, 27} = 0,029$, $p = 0,867$).

De ce fait, dans ces conditions expérimentales, les antagonistes nicotiques n'affectent pas les mouvements d'antennes ; cela renforce l'idée que les effets qu'induisent ces drogues lors d'apprentissages mécanosensoriels ne peuvent pas être imputés à un problème moteur.

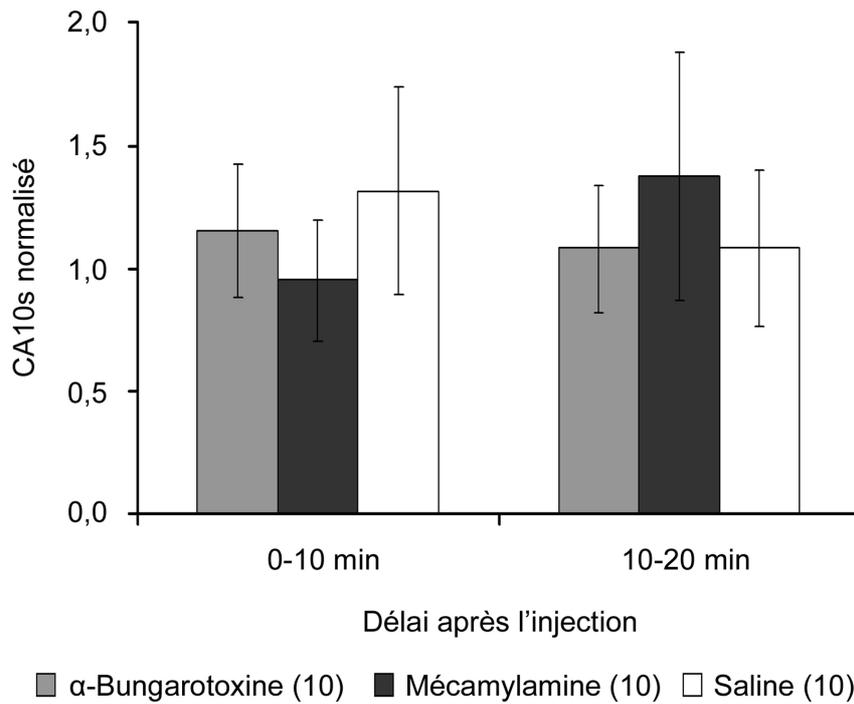


Figure 10 : moyenne des CA10s normalisés (avec erreur standard) après une injection d' α -bungarotoxine ou de mécamylamine.

1.2) Effet des drogues sur la sensibilité au sucre

Au cours de ces expériences, la sensibilité au sucre était évaluée une première fois en présentant à l'abeille des solutions de sucre de concentration croissante, et en comptant le nombre de REP effectués pour l'ensemble des solutions. Dix minutes après cette première détermination, les abeilles recevaient soit l'un des quatre antagonistes nicotiniques (plusieurs concentrations ont été utilisées) soit de la solution saline (volume de l'injection 0,5 μ l). Dix à vingt minutes après l'injection, la sensibilité au sucre était de nouveau évaluée, ce qui permet de calculer l'IM qui mesure la variation de la sensibilité au sucre suite au traitement. Cet **IM** est ensuite comparé entre le groupe témoin et le groupe traité, les différences significatives sont indiquées par des **étoiles** (*, ** ou ***) sur les graphiques. De plus, les proportions d'animaux répondant à la **plus forte concentration de sucre** (30%) ont été comparées entre les groupes après l'injection, les différences significatives sont alors indiquées par des **croix** (+, ++ ou +++).

1.2.1. Effet du MLA

La *figure 11* présente les indices de modulations pour différentes concentrations de MLA. Par rapport à la solution saline, cette drogue induit une baisse significative de l'indice de modulation à 10 μM et à 5 μM (test de Mann et Whitney, 10 μM : $U_{18, 17} = 57,5$, $p = 0,001$; 5 μM : $U_{26, 26} = 199,0$, $p = 0,011$). Les abeilles traitées à 10 μM étaient très affaiblies (diminution de la mobilité spontanée des antennes et de l'abdomen, très peu de réponse au sucre), mais celles traitées à 5 μM semblaient moins affectées ; ces deux groupes ont moins répondu à la solution sucrée la plus concentrée que les groupes contrôles correspondants (test exact de Fisher, 10 μM : $p = 1,5 \cdot 10^{-4}$; 5 μM , $p = 0,038$).

Par contre, la performance des animaux traités avec du MLA à 2 μM ne différait du groupe contrôle ni pour l'indice de modulation (test de Mann et Withney : $U_{21, 23} = 189,5$, $p = 0,220$), ni pour le taux de réponse à la plus forte concentration de sucre (test exact de Fisher, $p = 0,693$).

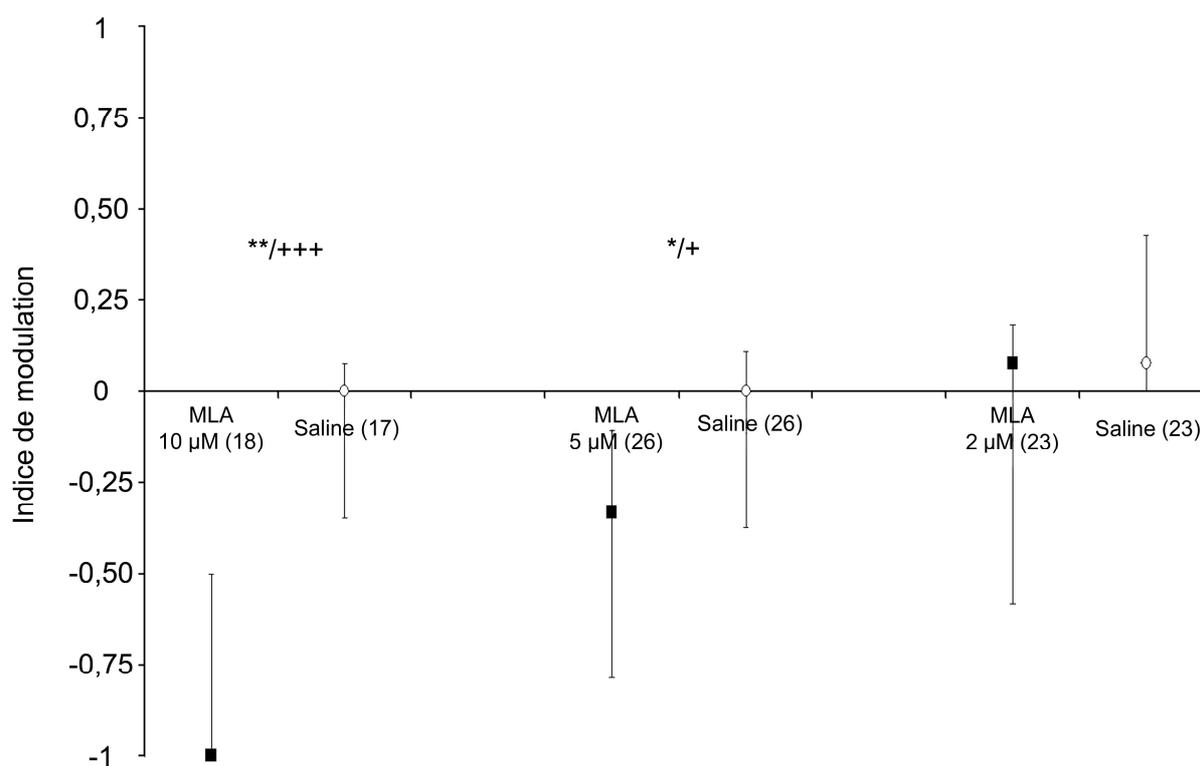


Figure 11 : effet du MLA sur la sensibilité au sucre.

1.2.2. Effet de la DHE

La figure 12 présente les variations de l'IM suite à l'injection de différentes doses de DHE. La plus forte de ces doses (10 mM) entraîne par rapport à la solution saline la quasi disparition de la mobilité spontanée des antennes et de l'abdomen et une très forte diminution de la sensibilité au sucre (test de Mann et Withney : $U_{12, 14} = 21,0$, $p = 4.10^{-4}$) ; même à la plus forte concentration de sucre les abeilles de ce groupe ne répondaient plus (test exact de Fisher, $p = 2.10^{-4}$).

Par contre, l'injection de concentrations inférieures de DHE n'a pas entraîné de conséquences sur l'IM (test de Mann et Withney, 5 mM : $U_{26, 25} = 312,5$, $p = 0,813$; 1 mM : $U_{18, 17} = 153,0$, $p = 0,999$) ou sur le taux de réponse à la plus concentrée des solutions sucrées (test exact de Fisher, 5 mM : $p = 0,668$; 1 mM, $p = 0,603$).

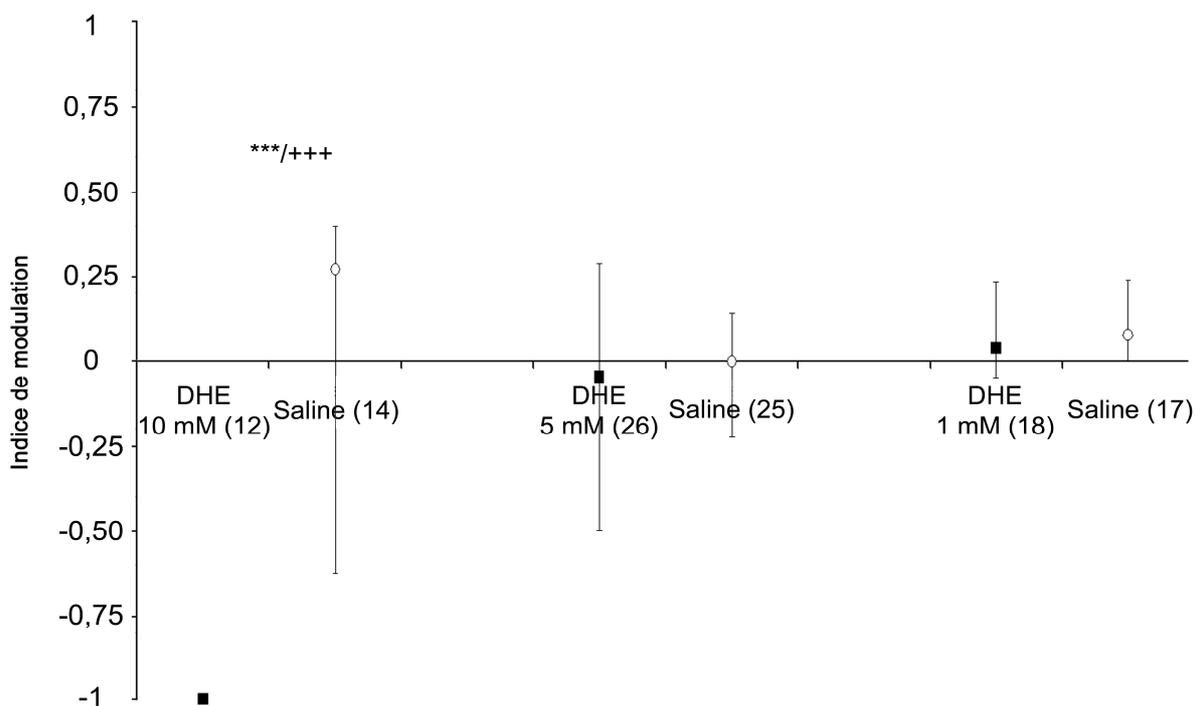


Figure 12 : effet de la DHE sur la sensibilité au sucre. Pour la DHE à 10 mM, il n'y a pas d'intervalle inter-quartile car presque tous les animaux avaient complètement cessé de répondre au sucre.

1.2.3. Effet de l' α -bungarotoxine

Comme on le voit dans la *figure 13*, l'injection d' α -bungarotoxine à 100 μ M induit par rapport aux groupes ayant reçu la solution saline une baisse de l'IM (test de Mann et Withney : $U_{44, 50} = 837,0$, $p = 0,044$; les médianes ne sont pas différentes, ce sont les distributions des valeurs dans chaque groupe qui varient) et a entraîné une baisse du taux de réponse à la concentration de sucre la plus élevée (test exact de Fisher : $p = 0,022$).

En contrepartie, le même volume d' α -bungarotoxine à 10 μ M ou à 1 μ M n'affecte pas l'IM (test de Mann et Withney, 10 μ M : $U_{33, 33} = 464,5$, $p = 0,302$; 1 μ M : $U_{21, 13} = 132,5$, $p = 0,886$) ou le taux de réponse à la solution de sucrose à 30% (test exact de Fisher, 10 μ M : $p = 0,389$; 1 μ M, $p = 0,682$).

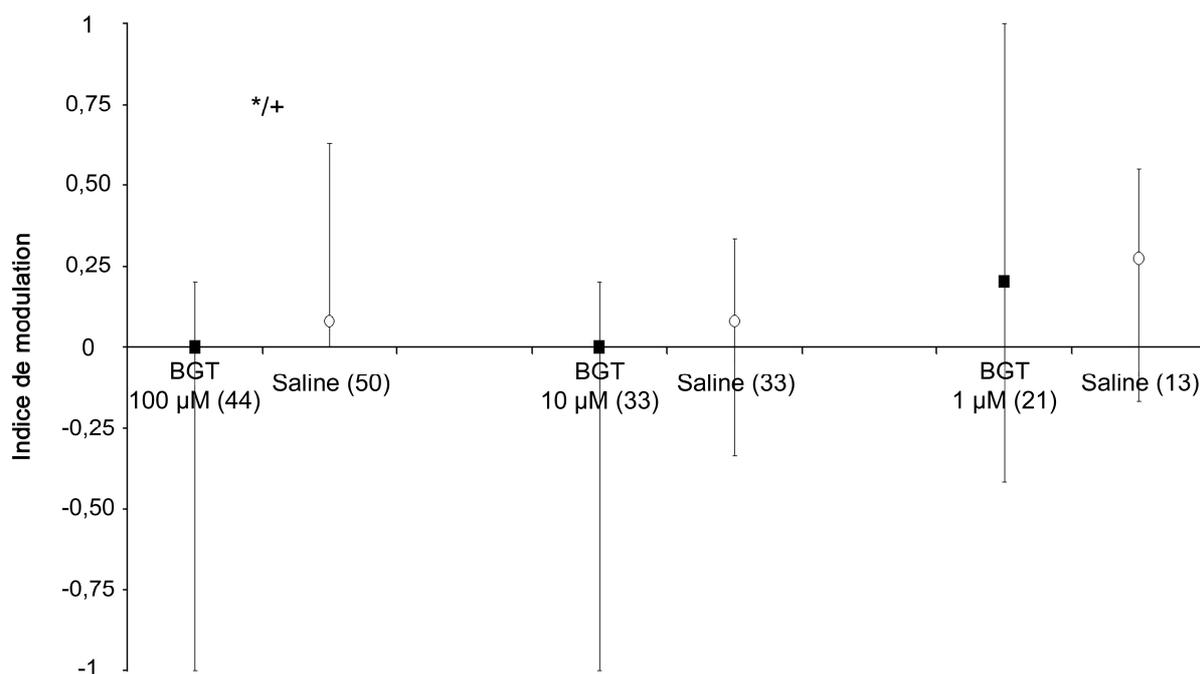


Figure 13 : effet de l' α -bungarotoxine sur la sensibilité au sucre. BGT = α -bungarotoxine.

1.2.4. Effet de la mécamylamine

La *figure 14* reporte les variations de l'IM suite à une injection de mécamylamine à 50 mM ou 10 mM. Il a déjà été rapporté que la concentration 100 mM est létale pour beaucoup d'abeilles (Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano, 1997), aussi n'a-t-elle pas été employée. La mécamylamine à 50 mM n'a pas d'effet sur la mortalité dans nos conditions expérimentales, cependant elle diminue fortement l'IM (test de Mann et Withney : $U_{20, 21} = 106,0$, $p = 0,005$) et le taux de réponse à la plus concentrée des solutions sucrées (test exact de Fisher : $p = 0,025$).

Par contre, la mécamylamine à 10 mM n'entraîne pas de différences par rapport à une injection de solution saline, ni sur l'IM (test de Mann et Withney : $U_{17, 17} = 127,0$, $p = 0,543$) ni sur le taux de réponse à la plus concentrée des solutions sucrées (test exact de Fisher : $p = 0,999$).

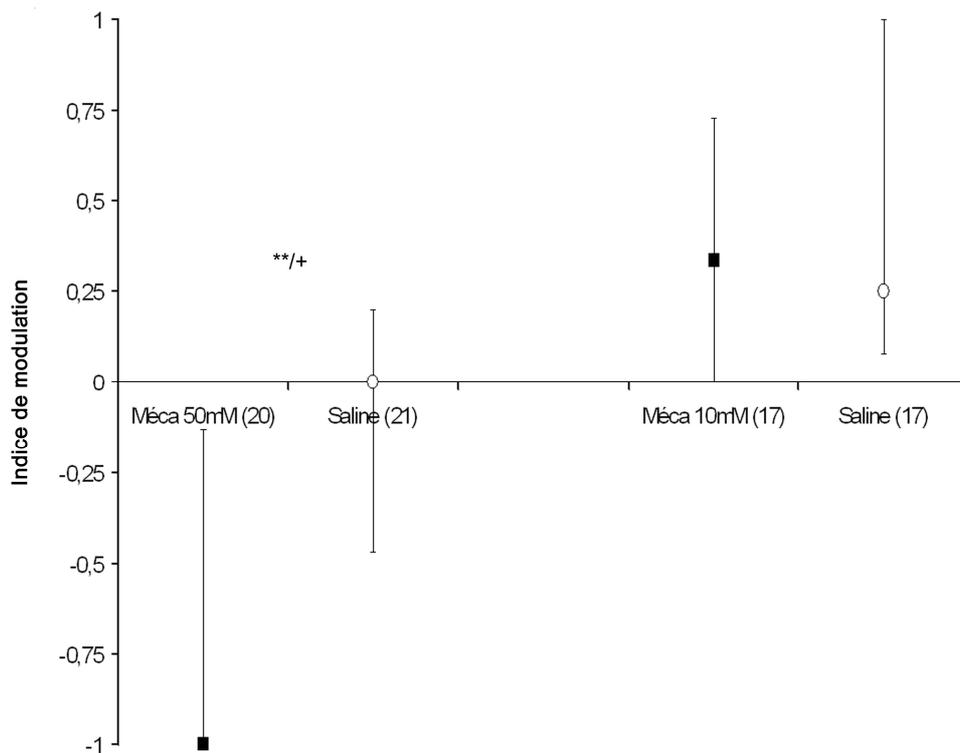


Figure 14 : effet de la mécamylamine sur la sensibilité au sucre. Méca = mécamylamine.

1.2.5 Bilan

Dans tous les cas où une baisse de la sensibilité au sucre était observée, la proportion d'animaux répondant à la plus forte concentration de solution sucrée diminuait également. Ces résultats ne permettent donc pas de déterminer si de fortes doses d'antagonistes nicotiniques bloquent la sensibilité au sucre en tant que telle, la perception du sucre ou la possibilité d'avoir un REP, voire deux ou trois de ces paramètres.

Cependant, ces données indiquent clairement que les concentrations les plus élevées ne doivent pas être utilisées pour étudier l'apprentissage et la mémoire sans risquer des effets non spécifiques sur la réaction des animaux au sucre (la récompense) plutôt que sur la mémoire, d'autant plus que les plus fortes concentrations semblent proches de la dose létale (elles entraînent un fort affaiblissement des animaux).

Aussi, dans la suite de ces expériences, seules les concentrations les plus basses seront utilisées, à savoir :

- 2 μ M pour le MLA,
- 10 mM pour la mécamylamine,
- 1 μ M pour l' α -bungarotoxine, et
- 1 mM pour la DHE.

Le L-NAME et le D-NAME seront également employés dans la suite des expériences. Cependant, ils n'ont pas été utilisés dans ce type d'expériences car Müller (1996) a déjà indiqué qu'aux concentrations qui affectent la mémoire (200 μ M), ces produits n'ont pas d'effet sur la sensibilité au sucre.

2) LE CONDITIONNEMENT MÉCANOSENSORIEL

Les performances des animaux à différents délais après l'apprentissage mécanosensoriel sont étudiées dans cette section.

2.1) Étude de différents protocoles d'apprentissage mécanosensoriel

2.1.1. Rappels à 20 minutes, 3 heures et 24 heures

Comme on ne sait pas combien de temps les abeilles sont capables de retenir l'apprentissage antennaire mécanosensoriel, on a testé leur performance lors de tests de rappel réalisés 20 minutes, 3 heures et 24 heures après l'apprentissage. Trois groupes d'abeilles non opérées ont été employés : un groupe conditionné en un essai, un groupe conditionné en cinq essais massés (c'est-à-dire séparés de 1 minute -on ne peut pas faire moins sans risquer une sensibilisation des animaux au stimulus sucré) et un groupe conditionné en cinq essais distribués (séparés de 20 minutes). La performance de ces différents groupes est reportée dans la *figure 15*.

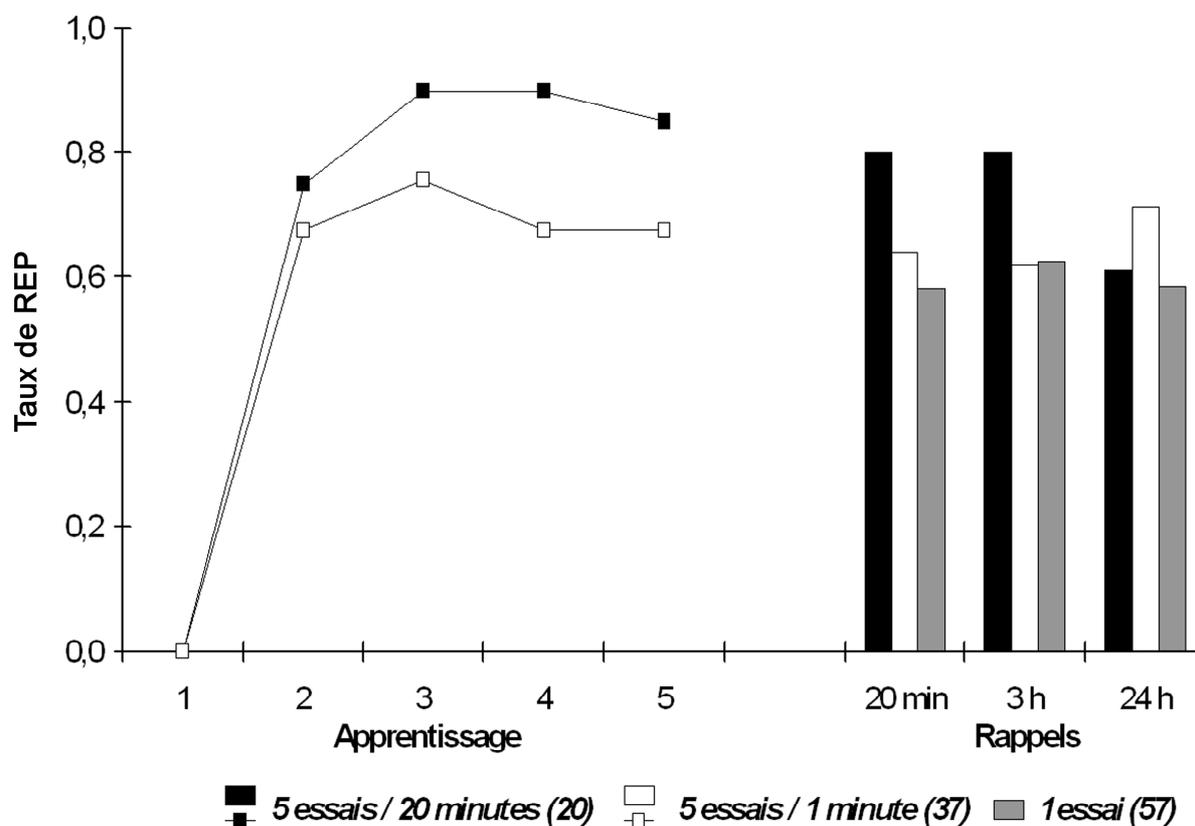


Figure 15 : performance lors de tests de rappel réalisés 20 minutes, 3 heures et 1 jour après différents protocoles d'apprentissages mécanosensoriels.

Il n'y avait pas de différence significative entre les performances des abeilles des différents groupes (test exact de Fisher entre les deux groupes d'apprentissage en cinq essais, 2ème essai : $p = 0,763$; 3ème essai : $p = 0,296$; 4ème essai : $p = 0,105$; 5ème essai : $p = 0,213$; test exact de Fisher entre les trois groupes, rappel à 20 minutes : $p = 0,229$; rappel à 3 heures : $p = 0,328$; rappel à 24 heures : $p = 0,565$). Ceci indique qu'un apprentissage en plusieurs essais distribués n'améliore pas la performance des abeilles par rapport à un apprentissage massé ou en un seul essai, ce qui n'implique pas que les formes de mémoire sous-tendant cette performance soient les mêmes dans les trois groupes. Par ailleurs, la performance des animaux ne diminue pas au cours des tests de rappel. De ce fait, trois tests de rappels non récompensés mais séparés dans le temps ne sont pas suffisants pour provoquer l'affaiblissement de la réponse apprise.

Lors des expériences impliquant des abeilles opérées (rapportées dans les sections suivantes), la performance des animaux est parfois inférieure et plus irrégulière, ce qui peut s'expliquer par un effet perturbateur de l'opération ou de l'injection.

2.1.2. Rappel à 3 jours

Pour savoir si la performance des abeilles trois jours après l'apprentissage est la même, une autre expérience a été conduite. Trois groupes d'animaux ont suivi chacun un protocole d'apprentissage (un essai, trois essais séparés de 1 minute et trois essais séparés de 10 minutes) puis ont été testés 3 jours plus tard ; un quatrième groupe d'abeilles était manipulé de la même façon mais était simplement nourri au lieu d'être conditionné. Ce groupe contrôle a été incorporé à l'expérience car après 3 jours de contention, certaines abeilles ont tendance à avoir une REP quel que soit le stimulus présenté. La présence de ce groupe contrôle permet de prendre en compte ce phénomène. Les résultats sont représentés dans la *figure 16*. Là encore, aucune différence n'a été observée entre les groupes (test exact de Fisher entre les deux groupes d'apprentissage en trois essais, 2ème essai : $p = 0,760$; 3ème essai : $p = 0,754$; test exact de Fisher entre les trois groupes conditionnés, rappel à 3 jours : $p = 0,198$). Si par contre on compare les animaux non conditionnés à ceux des trois autres groupes lors du rappel à 3 jours, il y a une différence très nette (test exact de Fisher entre les quatre groupes : $p = 2,4 \cdot 10^{-7}$), ce qui permet de confirmer que la réponse des animaux lors du rappel est bien le fruit d'un apprentissage. Le protocole d'apprentissage n'influence donc pas la performance des abeilles lors d'un apprentissage mécanosensoriel. Là encore, le fait que les performances des abeilles soient semblables n'indiquent pas que les traces mnésiques formées soient les mêmes.

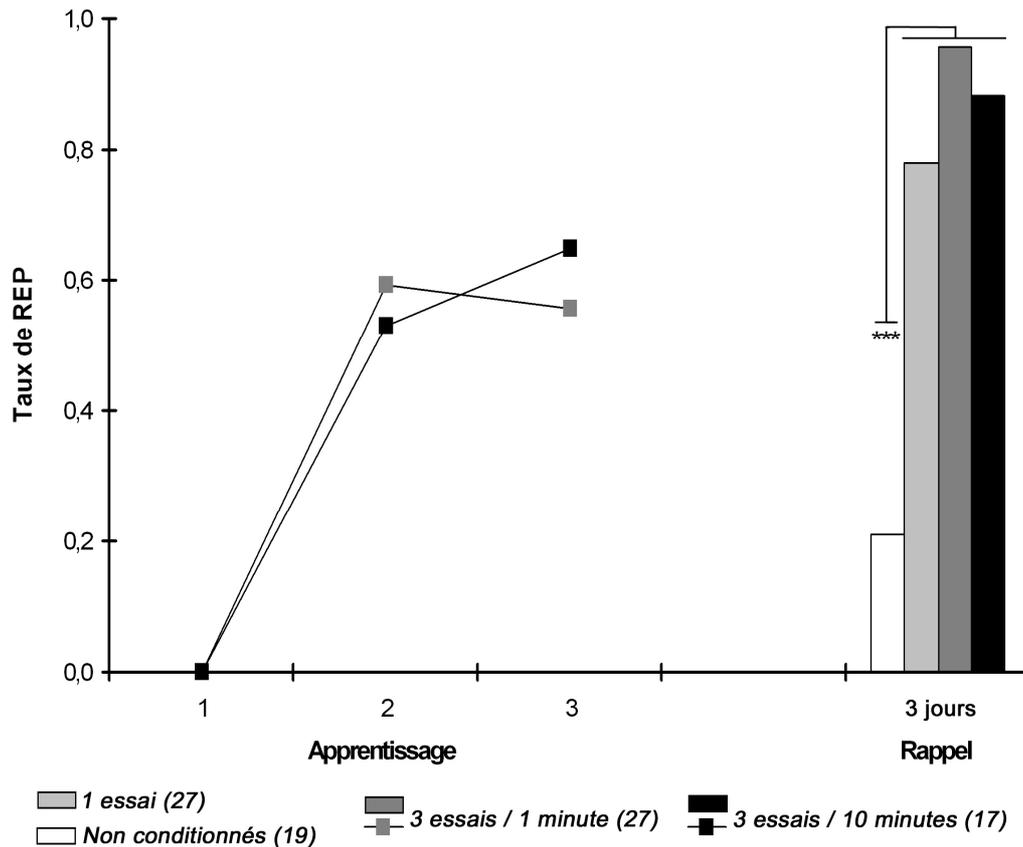


Figure 16 : performance à un test de rappel réalisé 3 jours après différents protocoles d'apprentissages mécanosensoriels.

2.2) Recherche d'un éventuel effet Kamin

L'effet Kamin désigne la baisse momentanée de la performance mnésique des animaux au cours de la période qui suit immédiatement l'apprentissage en un essai et la récupération consécutive d'un bon niveau de performance. Pour déterminer si l'apprentissage mécanosensoriel provoque un effet Kamin, 5 groupes indépendants d'abeilles non opérées ont été conditionnés en un seul essai et testés 1, 3, 10, 20 ou 30 minutes après l'acquisition. Les insectes n'étaient pas maintenus dans le contexte d'apprentissage entre l'acquisition et le premier test de rappel ; aucun d'entre eux ne répondait spontanément au placement dans le contexte lors du rappel. Les résultats sont reportés dans la *figure 17* page suivante. Aucune différence n'a été trouvée entre les cinq groupes (test exact de Fisher, $p = 0,979$). La consolidation ne se manifeste donc pas par un effet Kamin lors d'un apprentissage mécanosensoriel en un essai. Ceci indique donc que réaliser des rappels peu de temps après l'apprentissage mécanosensoriel n'affecte pas la performance des animaux.

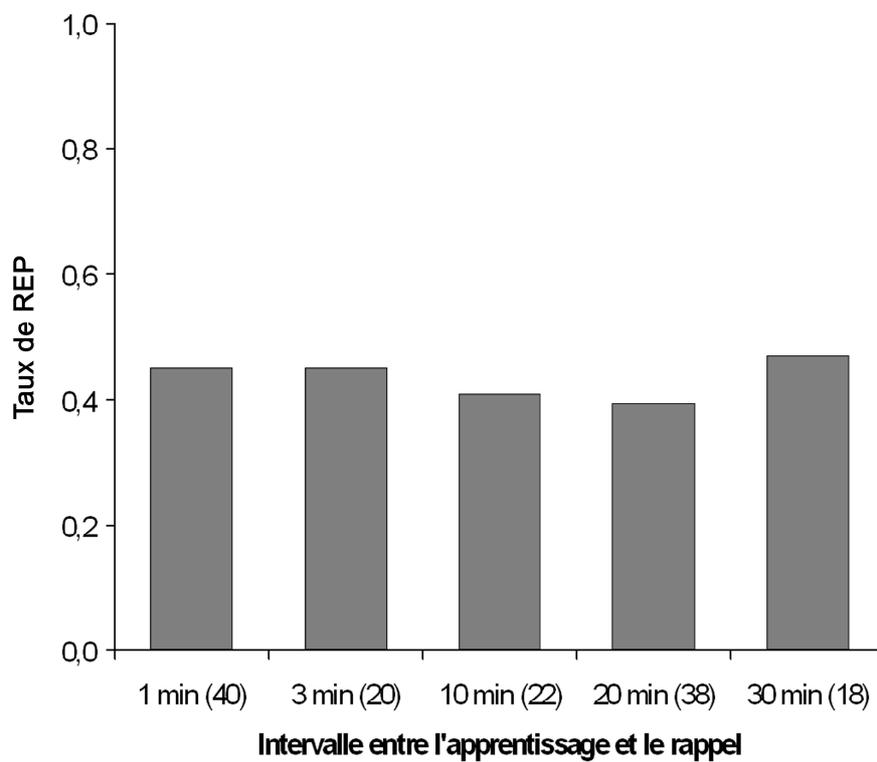


Figure 17 : performance lors de rappels réalisés à différents délais après un apprentissage mécanosensoriel en un essai.

3) EFFET DES DROGUES SUR LE RAPPEL

Les expériences rapportées dans cette section visaient à évaluer les effets des drogues sur les processus de rappel. Pour ce faire, les abeilles recevaient quelques minutes avant le test de rappel une injection des produits à tester, puis on évaluait leur performance. Dans ces conditions, le traitement ne peut affecter que le rappel, car l'injection est faite après l'apprentissage. Ce dernier était fait soit en un essai (formation d'une MMT) soit en plusieurs essais (formation d'une MMT et d'une MLT).

3.1) Apprentissage mécanosensoriel en un seul essai

3.1.1. Effet de la mécamylamine et de la bungarotoxine

Dans le protocole décrit *figure 18*, des abeilles ont été conditionnées en un essai, puis ont été testées une première fois 2 heures ou 23 heures après l'entraînement (données non montrées). L'objectif de ce premier test est d'évaluer la trace mnésique formée par les animaux avant l'injection ; leurs performances ne différaient pas significativement à ce stade (test exact de Fisher, 2 heures : $p = 0,999$; 23 heures : $p = 0,356$). Cinquante minutes après ce premier test, les animaux ont reçu une injection (0,3 μ l) de solution saline, d' α -bungarotoxine (1 μ M) ou de mécamylamine (10 mM) puis ont été testés de nouveau 10 minutes après cette injection (c'est-à-dire 3 heures ou 24 heures après l'apprentissage, soit 1 heure après le premier test). On a donc un premier test de rappel après l'apprentissage (2h ou 23h), l'injection, puis un deuxième test de rappel (3h ou 24) 10 minutes après l'injection.

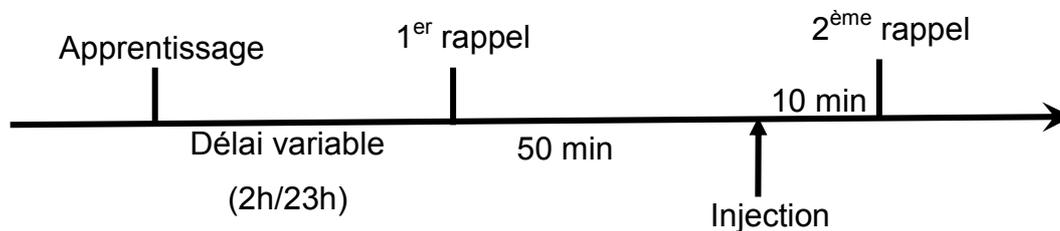


Figure 18

Les résultats sont présentés dans la *figure 19A*. Les performances des trois groupes différaient significativement (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,049$; 24 heures : $p = 0,004$). Cette différence provient des abeilles traitées à la mécamylamine, qui ont une performance diminuée par rapport aux animaux ayant reçu de la solution saline ou de l' α -bungarotoxine. Ceci indique que la mécamylamine bloque les processus de rappel de la MMT formée lors d'un apprentissage mécanosensoriel en un seul essai.

3.1.2. Effet du MLA et de la DHE

Du MLA (2 μM) ou de la DHE (1 mM) ont été injectés (0,5 μl) 15 minutes avant un rappel effectué 3h ou 24h après un apprentissage en un seul essai (le protocole était le même que pour la mécamylamine et l' α -bungarotoxine, sauf qu'il n'y avait pas un premier test de rappel avant l'injection). Il n'y avait pas de différences significatives entre les animaux ayant reçu du MLA, de la DHE ou de la solution saline (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,551$; 24 heures : $p = 0,750$), comme on le voit dans la *figure 19B*. Ces deux drogues n'ont donc pas d'effet sur le rappel d'un apprentissage mécanosensoriel en un seul essai.

3.1.3. Effet du L-NAME

La *figure 19C* présente la performance des abeilles après une injection (0,5 μl) de D-NAME (200 μM) ou de L-NAME (200 μM) faite 15 minutes avant un test de rappel effectué 3 heures ou 24 heures après un apprentissage mécanosensoriel en un essai (selon le même protocole que pour le MLA et la DHE). Les animaux traités au L-NAME ont eu des performances comparables à celle du D-NAME dans les deux cas (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,292$; 24 heures : $p = 0,621$) ; la synthèse de NO ne joue donc pas de rôle dans le rappel d'un conditionnement mécanosensoriel en un seul essai.

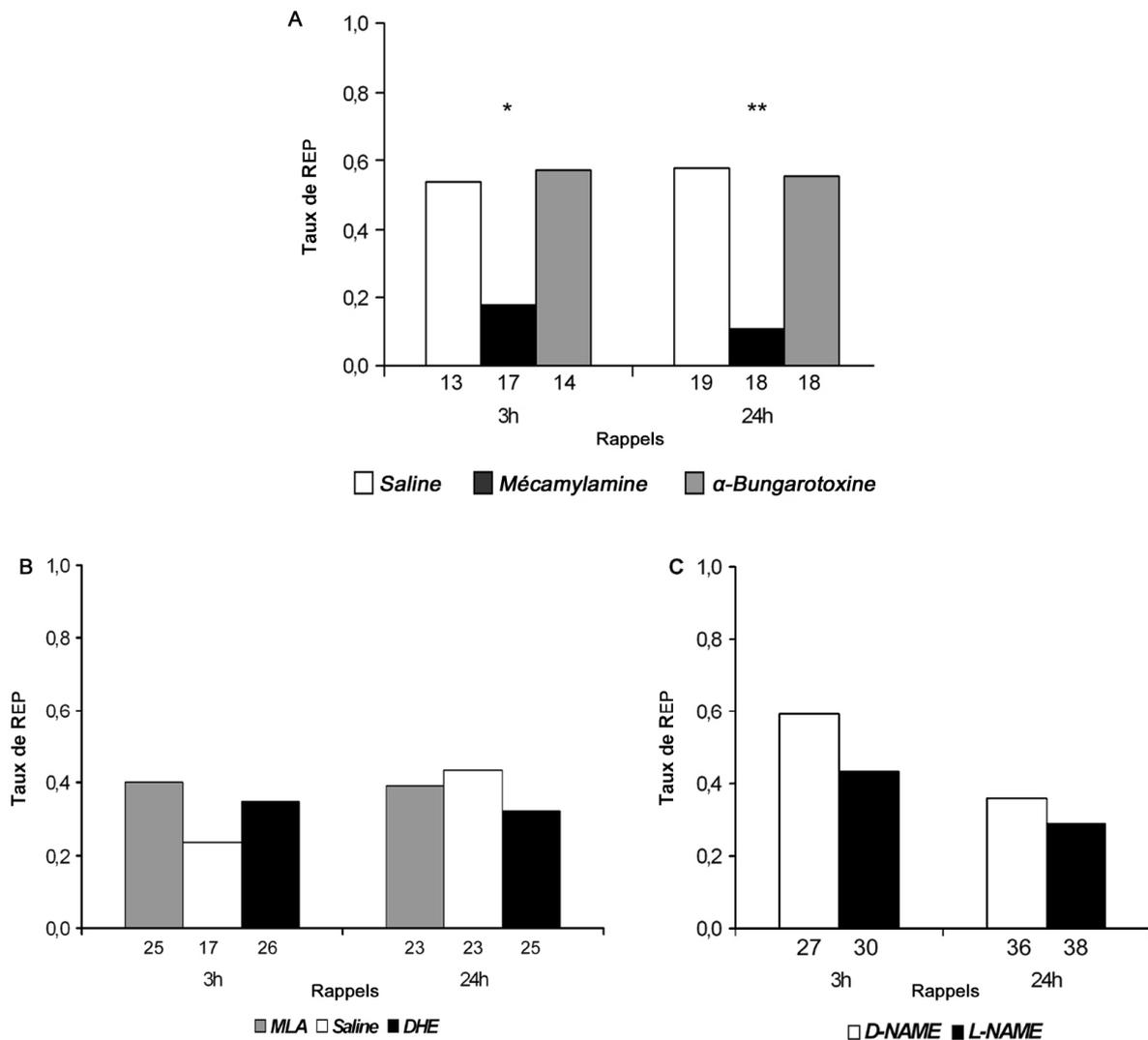


Figure 19 : effets de différentes drogues sur le rappel d'un apprentissage mécanosensoriel en un essai. Ces rappels étaient effectués 3 heures ou 24 heures après l'acquisition. **A** : effets de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine ; **B** : effets du MLA et de la DHE ; **C** : effets du L-NAME et du D-NAME. L'injection avait lieu 10 ou 15 minutes avant le test de rappel.

3.2) Apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais

Lors de ces expériences, on a suivi le même protocole que pour les expériences correspondantes dans l'apprentissage en un essai, sauf que l'apprentissage se faisait en 5 essais (avec un premier test de rappel précédant l'injection, α -bungarotoxine et mécamylamine) ou 3 essais (sans test de rappel précédant l'injection, autres drogues).

3.2.1. Effet de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine

Les performances lors de l'acquisition et du test de rappel fait 50 minutes avant une injection de 0,3 μ l d' α -bungarotoxine (1 μ M), de mécamylamine (10 mM) ou de solution saline étaient semblables dans tous les groupes, aussi bien pour les groupes testés à 3 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,879$; 3^{ème} essai : $p = 0,879$; 4^{ème} essai : $p = 0,770$; 5^{ème} essai : $p = 0,999$; test à 2 heures : $p = 0,103$) que pour les groupes testés à 24 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,875$; 3^{ème} essai : $p = 0,866$; 4^{ème} essai : $p = 0,625$; 5^{ème} essai : $p = 0,758$; test à 23 heures : $p = 0,839$).

Les résultats sont présentés dans les figures 20A (3 heures) et 20B (24 heures). Il y avait après l'injection une différence significative entre les trois groupes (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,010$; 24 heures : $p = 0,048$). Dans les deux cas, les animaux traités à la mécamylamine avaient des performances inférieures.

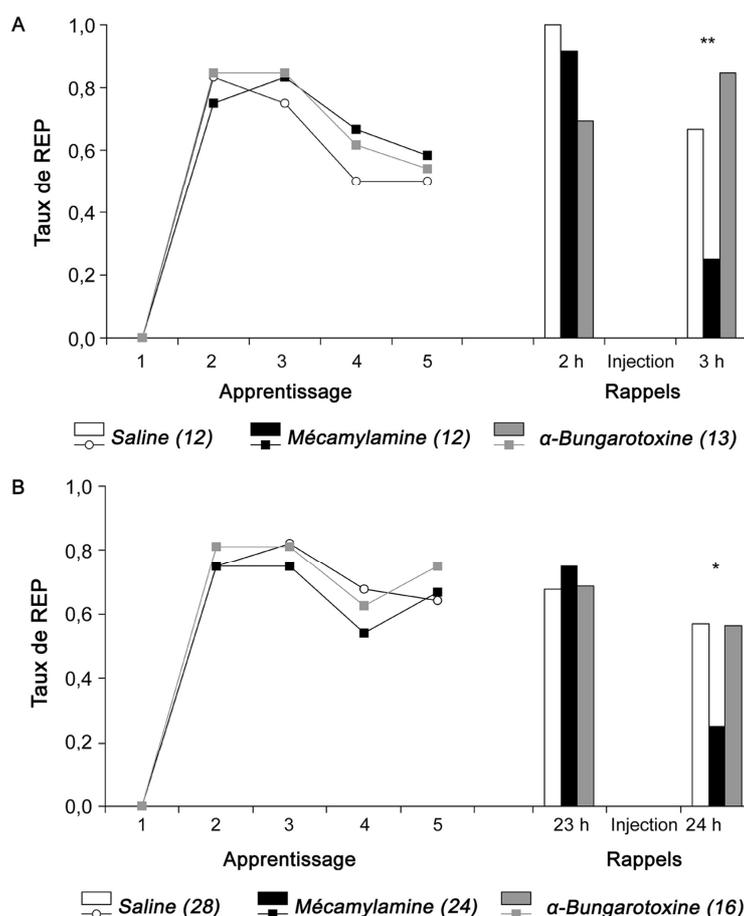


Figure 20 : effets de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine sur le rappel 3 heures (A) ou 24 heures (B) après un apprentissage mécanosensoriel en 5 essais. L'injection avait lieu 10 minutes avant le rappel.

3.2.2. Effet du MLA et de la DHE

Lors de cette expérience, les animaux ont reçu 0,5 µl de MLA (2 µM), de DHE (1 mM) ou de solution saline. Les figures 21 A et 21 B montrent les résultats respectivement pour le rappel à 3 heures et à 24 heures. Les performances des abeilles avant l'injection

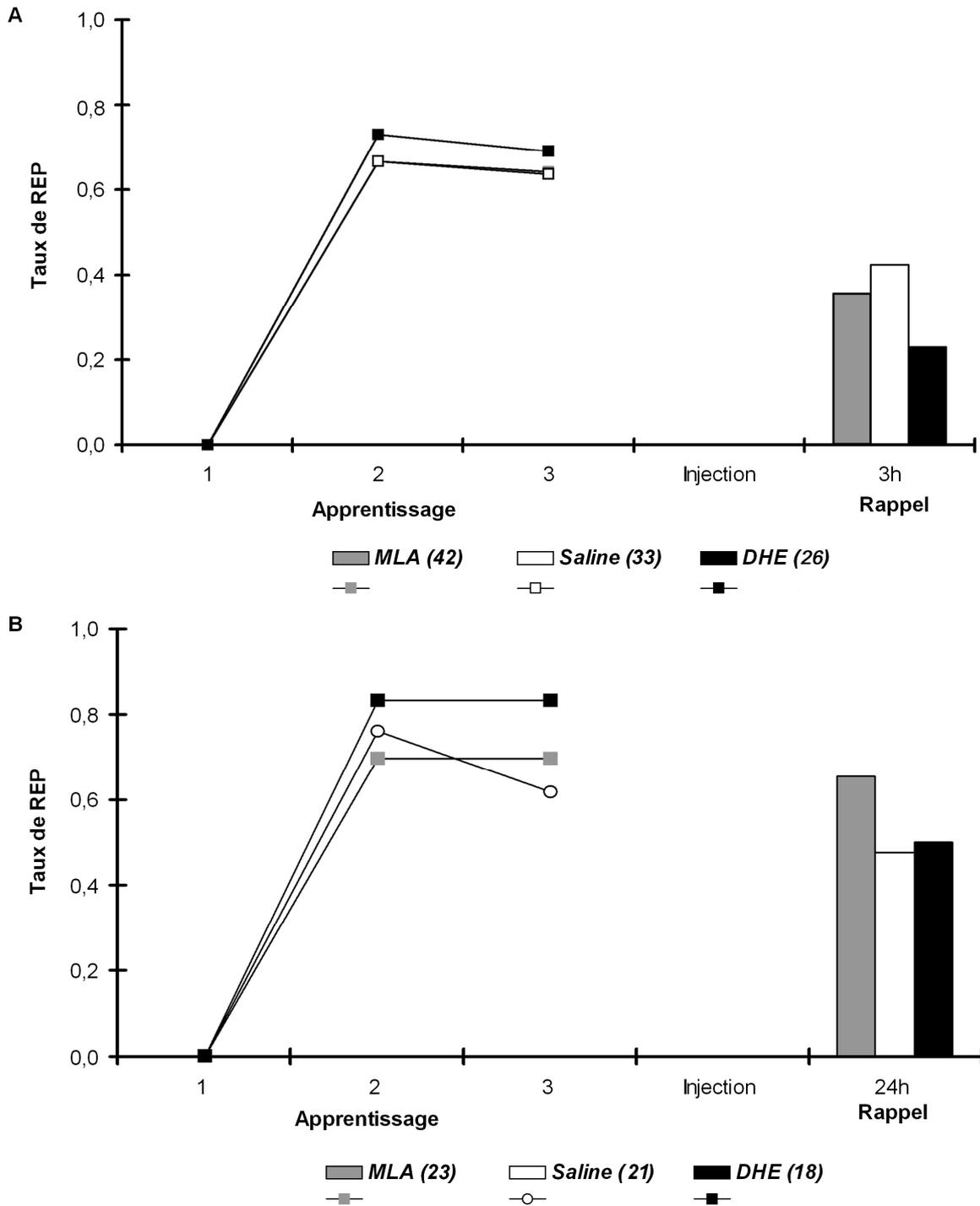


Figure 21 : effets de la DHE et du MLA sur le rappel 3 heures (A) ou 24 heures (B) après un apprentissage mécanosensoriel en 3 essais. L'injection avait lieu 15 minutes avant le rappel. En A, les courbes des animaux injectés avec le MLA ou la solution saline sont superposées.

étaient identiques, aussi bien pour le rappel à 3 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,891$; 3^{ème} essai : $p = 0,929$) que pour le rappel à 24 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,613$; 3^{ème} essai : $p = 0,340$). Lors du rappel, ni les performances des abeilles injectées avec le MLA ni celles injectées avec la DHE ne différaient de celles des groupes injectés avec de la solution saline (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,290$; 24 heures : $p = 0,478$). Aussi, la DHE et le MLA n'affectent pas le rappel d'un apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais.

3.2.3. Effet du L-NAME

Au cours de cette expérience, les abeilles ont reçu quinze minutes avant le test de rappel (3 heures ou 24 heures après l'apprentissage) du D-NAME (200 μM , volume 0,5 μl) ou du L-NAME (200 μM , même volume). Les *figures 22A* (rappel à 3 heures) et *22B* (rappel à 24 heures) rapportent les résultats obtenus. Durant l'apprentissage (c'est-à-dire avant l'injection), les performances des animaux étaient identiques, que le rappel ait lieu à 3 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,622$; 3^{ème} essai : $p = 0,804$) ou à 24 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,999$; 3^{ème} essai : $p = 0,999$). Dans les deux cas, le L-NAME n'a pas eu d'effet sur le rappel (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,999$; 24 heures : $p = 0,999$).

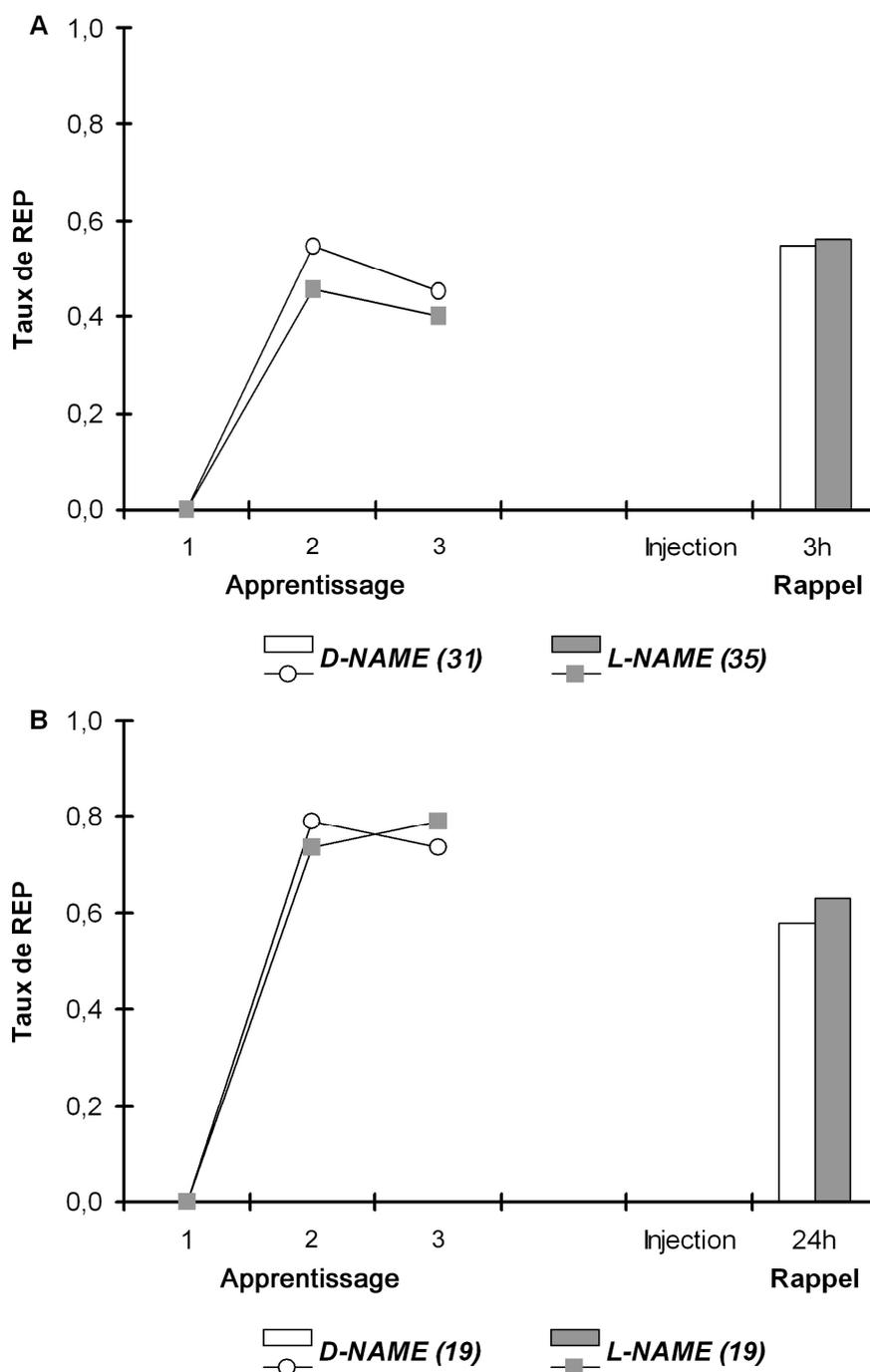


Figure 22 : effets du L-NAME et du D-NAME sur le rappel 3 heures (A) ou 24 heures (B) après un apprentissage mécanosensoriel en 3 essais. L'injection avait lieu 15 minutes avant le rappel.

3.3) Évaluation de la durée d'effet de la mécamylamine

La mécamylamine est donc la seule drogue à affecter le rappel. Pour évaluer la durée de son effet sur ce processus, le protocole suivant a été employé. Les abeilles étaient testées 20 minutes après un apprentissage mécanosensoriel en un seul essai (données non montrées).

Immédiatement après ce premier test, les animaux recevaient une injection (0,3 µl) de solution saline, d'α-bungarotoxine (1 µM) ou de mécamylamine (10 mM). Les abeilles étaient ensuite réparties dans quatre groupes testés à différents délais après l'injection : 10 minutes, 15 minutes, 20 minutes ou 30 minutes (une expérience préliminaire a montré que les animaux sont encore perturbés 5 minutes après l'injection et que leurs performances sont diminuées quel que soit le produit injecté). En procédant de la sorte, on peut évaluer la durée de l'effet éventuel des drogues sur la capacité des animaux à restituer les informations : en effet, les différents délais permettent de voir combien de temps la drogue agit, et si ses effets sont réversibles ou pas. Ce protocole est résumé dans la *figure 23*. Cette expérience n'a pas été menée avec la DHE, le MLA et le L-NAME, car ces drogues n'affectent pas le rappel.

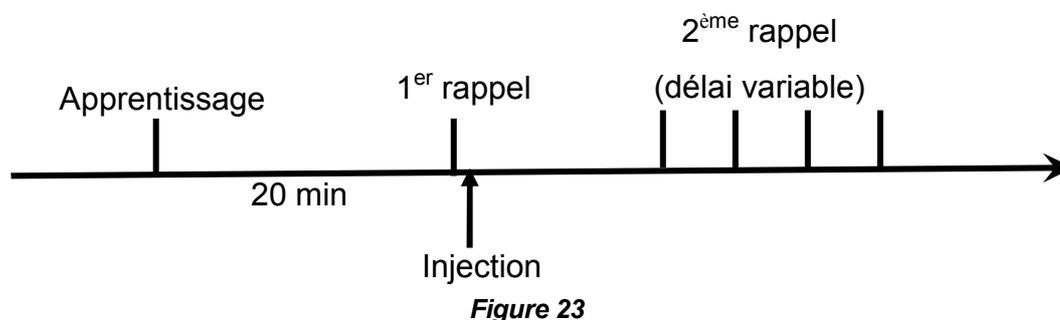


Figure 23

Les abeilles testées 20 minutes après l'injection ont été de plus testées de nouveau 1 heure après l'injection, et celles testées 15 minutes après ont été testées de nouveau 3 heures après. La performance des insectes lors du premier test (juste avant l'injection) était la même dans tous les groupes (test exact de Fisher, 10 minutes : $p = 0,860$; 15 minutes : $p = 0,918$; 20 minutes : $p = 0,675$; 30 minutes : $p = 0,695$; 1 heure : $p = 0,611$; 3 heures : $p = 0,999$).

La *figure 24* présente les résultats obtenus. Pendant 30 minutes, il y avait une différence significative entre les trois groupes (test exact de Fisher, 10 minutes : $p = 0,039$; 15 minutes : $p = 0,001$; 20 minutes : $p = 0,019$; 30 minutes : $p = 0,045$). Cette différence provenait d'une forte inhibition de la performance des abeilles traitées à la mécamylamine. Par contre, il n'y avait plus de différence entre les trois groupes 1 heure (test exact de Fisher, $p = 0,102$) et 3 heures (test exact de Fisher, $p = 0,928$) après le traitement.

L'effet amnésiant de la mécamylamine est donc transitoire, puisqu'il se manifeste pendant 30 minutes et disparaît par la suite. Ceci est d'autant plus net que les animaux testés à 1 heure et 3 heures (pour lesquels il n'y a plus d'effet de la mécamylamine) avaient montré une baisse de performance mesurée respectivement 20 minutes et 15 minutes après l'injection.

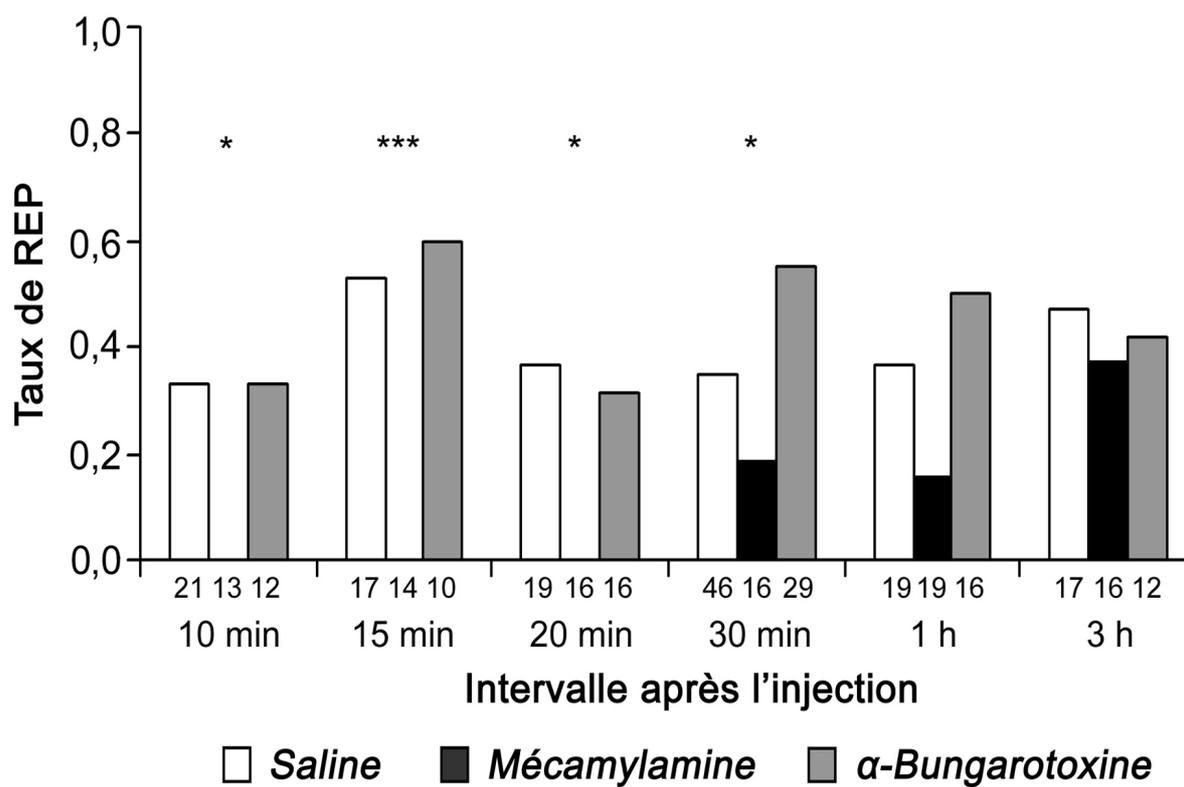


Figure 24 : performance lors des tests de rappel des groupes d'abeilles testées à différents délais après une injection de mécamylamine, d'α-bungarotoxine ou de solution saline.

4) EFFET DES DROGUES SUR L'APPRENTISSAGE

Pour étudier l'effet des drogues sur les processus d'apprentissage, les injections ont été réalisées avant l'entraînement, puis la performance des animaux lors du rappel était évaluée à différents délais. La mécamylamine est la seule drogue qui affecte le rappel, et ses effets sont transitoires (moins d'une heure) ; aussi, un déficit observé lors d'un test de rappel effectué plus d'une heure après l'apprentissage ne peut s'interpréter que comme une perturbation de l'acquisition et/ou de la consolidation. L'apprentissage était fait soit en un essai (formation d'une MMT), soit en plusieurs essais (formation de la MMT et de la MLT).

4.1) Apprentissage mécanosensoriel en un seul essai

4.1.1. Effet de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine sur l'acquisition

Pour évaluer les effets de l' α -bungarotoxine (1 μ M, 0,3 μ l) et de la mécamylamine (10 mM) sur l'apprentissage en un essai, on a injecté ces drogues 10 minutes avant l'acquisition, et les abeilles ont été testées 3 heures ou 24 heures après l'apprentissage (voir le protocole *figure 25*). Les résultats sont présentés *figure 26A*. Il y avait une différence significative entre les trois groupes aussi bien 3 heures (test exact de Fisher : $p = 1,7 \cdot 10^{-4}$) que 24 heures (test exact de Fisher : $p = 0,019$) après l'acquisition ; cette différence provenait des animaux traités à la mécamylamine, qui ont des performances très basses.

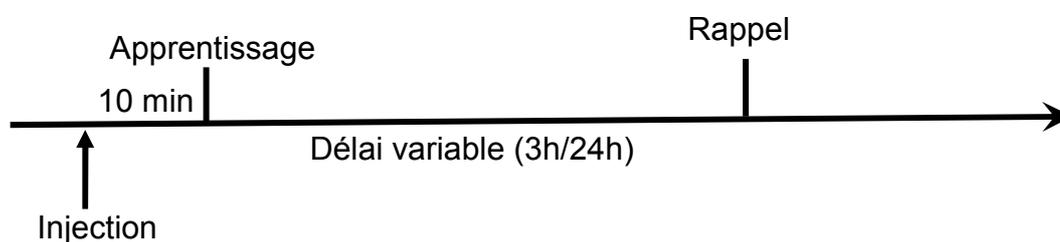


Figure 25

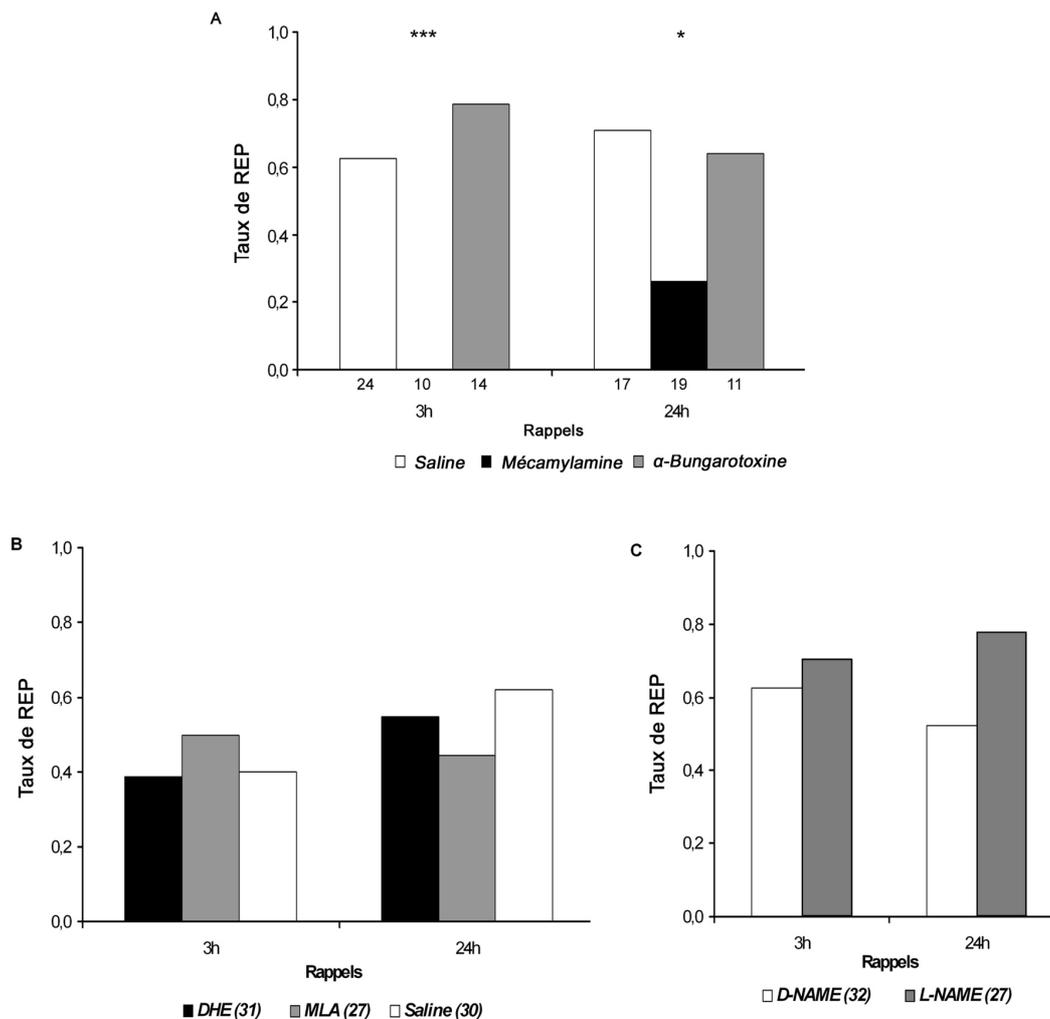


Figure 26 : effets de différentes drogues sur l'apprentissage mécanosensoriel en un essai. Les rappels étaient effectués 3 heures et/ou 24 heures après un apprentissage en 1 essai ; l'injection avait lieu 10 ou 15 minutes avant l'apprentissage. **A** : mécamylamine et α -bungarotoxine ; **B** : L-NAME et D-NAME ; **C** : MLA et DHE.

4.1.2. Effet de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine sur la consolidation

Les expériences précédentes ont indiqué qu'au-delà de 1 heure après l'apprentissage, la mécamylamine n'agit plus sur le rappel ; mais comme l'injection était réalisée avant l'apprentissage dans l'expérience précédente, elle pouvait affecter tant l'acquisition que la consolidation qui s'en suivait. Cette expérience a donc été répliquée dans les mêmes conditions, sauf que la mécamylamine était injectée immédiatement après l'apprentissage, de façon à n'affecter que la consolidation. Les résultats sont présentés sur la *figure 27* page suivante.

La mécamylamine n'induit plus aucun effet dans ces conditions (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,515$; 24 heures, $p = 0,721$). On conclue donc que cette drogue n'affecte pas la consolidation mais bloque l'acquisition d'un apprentissage mécanosensoriel en un essai, tout comme elle affecte l'acquisition olfactive en un essai (Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano,

1997 ; Cano Lozano et al., 2001). L' α -bungarotoxine n'a pas été employée dans cette expérience sur la consolidation, car les résultats obtenus indiquent que cette drogue n'affecte ni l'acquisition ni la consolidation.

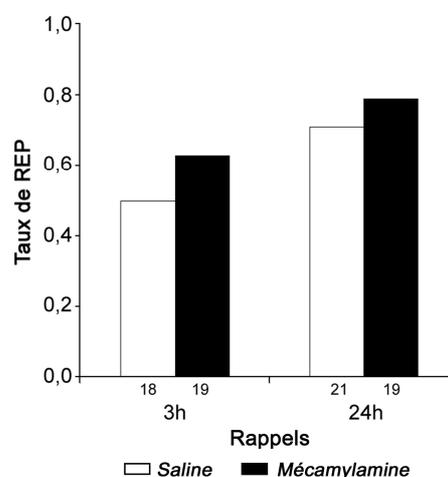


Figure 27 : effet de la mécamylamine sur la consolidation ; les tests de rappel étaient faits 3 heures ou 24 heures après un apprentissage mécanosensoriel en un essai. L'injection avait lieu immédiatement après l'apprentissage.

4.1.3. Effet du MLA et de la DHE

La même expérience a été conduite en injectant de la DHE (1 mM, 0,5 μ l) ou du MLA (2 μ M, 0,5 μ l) 15 minutes avant l'apprentissage, et en testant les animaux 3 heures et 24 heures après l'apprentissage. La *figure 26B* page précédente rapporte les résultats. Il n'y avait pas de différence significative entre les trois groupes (test exact de Fisher, 3 heures : $p = 0,722$; 24 heures : $p = 0,492$), ce qui indique que ni la DHE ni le MLA n'affectent l'acquisition ou la consolidation de la mémoire après un apprentissage mécanosensoriel en un essai.

4.1.4. Effet du L-NAME

Tout comme pour la DHE et le MLA, du L-NAME (200 μ M, 0,5 μ l) ou du D-NAME (200 μ M, 0,5 μ l) ont été injectés 15 minutes avant un apprentissage mécanosensoriel en un essai ; des tests de rappel ont été pratiqués 3 heures et 24 heures après l'apprentissage. La *figure 26C* page précédente présente les résultats. On constate que l'inhibition de la synthèse de NO n'affecte la performance des animaux ni 3 heures (test exact de Fisher : $p = 0,589$) ni 24 heures (test exact de Fisher : $p = 0,114$) après l'apprentissage. Cette enzyme n'est donc impliquée ni dans l'acquisition ni dans la consolidation de la mémoire après un apprentissage mécanosensoriel en un essai.

4.2) Apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais

4.2.1. Effet de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine

Afin d'évaluer l'effet de l' α -bungarotoxine (1 μ M, volume 0,3 μ l) et de la mécamylamine (10 mM) sur l'apprentissage en plusieurs essais, ces drogues ont été injectées 10 minutes avant un apprentissage en cinq essais (*figure 28*). Les animaux ont ensuite été testés 20 minutes, 3 heures et 24 heures après l'acquisition. Les résultats sont rapportés dans la *figure 29A* page suivante.

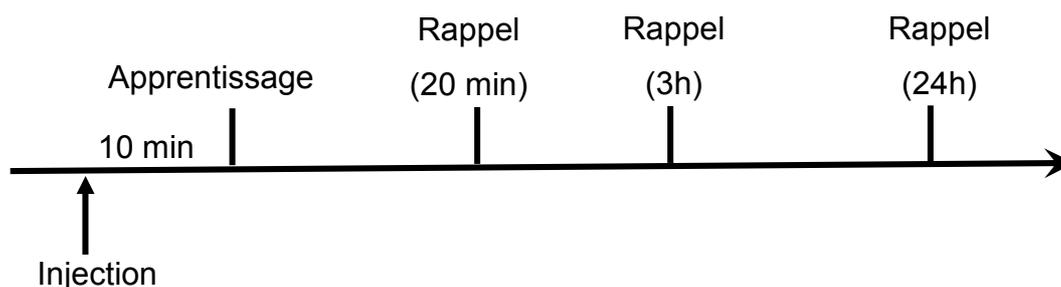


Figure 28

Au cours de l'apprentissage, il y a eu une différence significative dans les performances des animaux des trois groupes (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,029$; 3^{ème} essai : $p = 0,005$; 4^{ème} essai : $p = 0,045$; 5^{ème} essai : $p = 0,008$) ; les deux drogues mènent à des performances inférieures lors des 2^{ème} et 3^{ème} essais (test exact de Fisher ajusté par la méthode de Holm pour des comparaisons multiples, 2^{ème} essai, groupes mécamylamine et saline : $p = 0,056$; 2^{ème} essai, α -bungarotoxine et saline : $p = 0,056$; 3^{ème} essai, mécamylamine et saline : $p = 0,014$; 3^{ème} essai, α -bungarotoxine et saline : $p = 0,014$), ensuite seule la mécamylamine induit un effet (test exact de Fisher ajusté par la méthode de Holm pour des comparaisons multiples, 4^{ème} essai, groupes mécamylamine et saline : $p = 0,049$; 4^{ème} essai, α -bungarotoxine et saline : $p = 0,213$; 5^{ème} essai, mécamylamine et saline : $p = 0,010$; 5^{ème} essai, α -bungarotoxine et saline : $p = 0,099$). Cette baisse est également présente pour la mécamylamine 20 minutes après l'acquisition (test exact de Fisher, $p = 0,028$). Cette diminution de la performance des animaux traités à la mécamylamine s'explique facilement par les résultats précédents : en effet, on sait que cette drogue bloque transitoirement le rappel de la trace mnésique. Lors du rappel effectué 3 heures après l'acquisition, il n'y avait plus de différence entre les trois groupes (test exact de Fisher, $p = 0,406$), du fait que la drogue n'est plus active. Injectée avant l'apprentissage, la mécamylamine ne bloque donc ni l'acquisition, ni la consolidation d'un apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais.

Par contre, 24 heures après l'acquisition, la performance des animaux traités à l' α -bungarotoxine était significativement inférieure à celle des abeilles des deux autres groupes (test exact de Fisher, $p = 0,011$). Étant donné que ces animaux avaient auparavant de bonnes

performances, on en conclue que la formation de la MLT (qui sous-tend la mémoire à 24h) a été bloquée, ou bien que l' α -bungarotoxine a un effet sur le rappel de la MLT très long à apparaître.

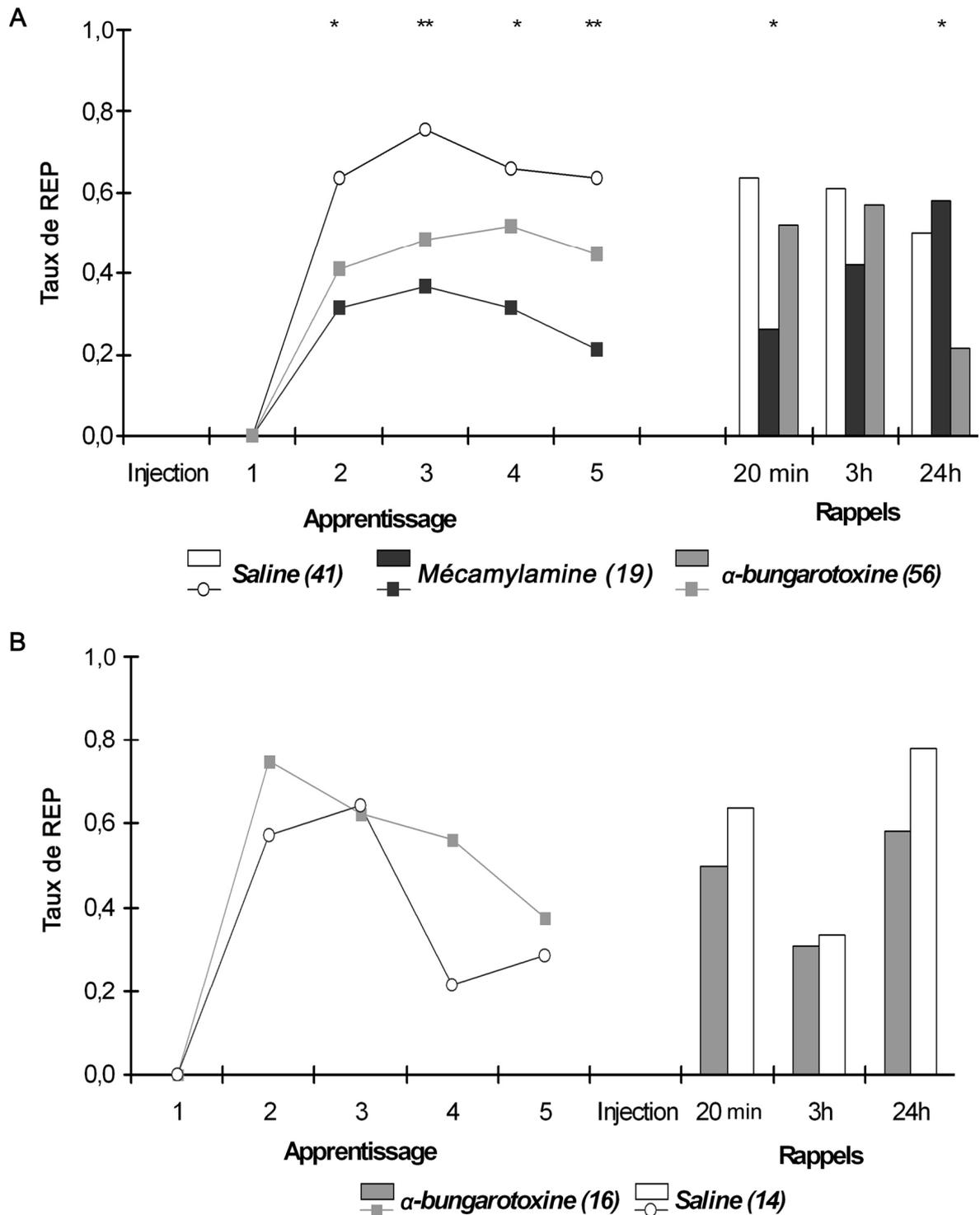


Figure 29 : effets de la mécamylamine et de l' α -bungarotoxine sur l'apprentissage mécanosensoriel en cinq essais. Les rappels étaient effectués 20 minutes, 3 heures et 24 heures après l'acquisition. **A** : injection 10 minutes avant l'acquisition ; **B** : injection immédiatement après.

4.2.2. Effet d'une injection d' α -bungarotoxine après l'apprentissage

Pour déterminer si l' α -bungarotoxine peut affecter la MLT lorsqu'on l'administre après l'apprentissage, l'expérience précédente a été répliquée avec le même protocole, sauf que l'injection avait lieu immédiatement après l'apprentissage. Seule l' α -bungarotoxine a été employée, car la mécamylamine n'affecte pas la MLT. La *figure 29B* présente les résultats obtenus. Lors de l'apprentissage (avant l'injection), il n'y avait pas de différence entre les deux groupes d'animaux, y compris lors du 4^{ème} essai où l'écart entre les groupes est plus important (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,442$; 3^{ème} essai : $p = 0,999$; 4^{ème} essai : $p = 0,072$; 5^{ème} essai : $p = ,0709$). Lors des rappels (après l'injection), il n'y avait aucune différence entre les abeilles ayant reçu de l' α -bungarotoxine et celles ayant reçu l'injection contrôle de solution saline (test exact de Fisher, 20 minutes : $p = 0,689$; 3 heures : $p = 0,999$; 24 heures : $p = 0,642$).

Ceci indique que l' α -bungarotoxine n'a pas d'effet à très long terme sur le rappel de la MLT, et qu'elle laisse intacte la phase tardive de la consolidation (c'est-à-dire la part de consolidation qui s'opère après la fin de l'acquisition en plusieurs essais). Comme on ne peut pas dissocier l'acquisition en plusieurs essais du début de la consolidation (puisque celle-ci commence dès la fin du premier essai, alors que l'apprentissage n'est pas terminé), on ne peut pas savoir si l' α -bungarotoxine affecte l'acquisition, la consolidation ou ces deux phénomènes. On conclue donc que cette drogue bloque la formation de la MLT (sans plus de précisions) et n'affecte pas la MMT.

4.2.3. Effet du MLA et de la DHE

L'expérience précédente sur la mécamylamine et l' α -bungarotoxine a été répliquée avec un apprentissage en trois essais réalisés 15 minutes après une injection de MLA (2 μ M, volume 0,5 μ l) ou de DHE (1 mM). Les tests de rappels étaient réalisés 3 heures et 24 heures après l'acquisition. Les résultats ont été reportés *figure 30A* page suivante.

Lors de l'acquisition et du test de rappel à 3 heures, les différents groupes d'animaux ont eu des taux de REP comparables (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,878$; 3^{ème} essai : $p = 0,203$; rappel à 3 heures : $p = 0,621$). Par contre, 24 heures après l'apprentissage, les trois groupes sont différents (test exact de Fisher : $p = 0,015$). Les animaux traités à la DHE ne différaient pas de ceux traités avec la solution saline ou le MLA (test exact de Fisher ajusté par la méthode de Holm pour des comparaisons multiples : $p = 0,212$ et $p = 0,393$ respectivement). Par contre, les animaux traités au MLA ont un taux de REP significativement inférieur à celle des animaux

traités à la solution saline (test exact de Fisher ajusté par la méthode de Holm pour des comparaisons multiples : $p = 0,022$). Tout comme pour l' α -bungarotoxine, ceci peut s'expliquer par un effet sur la formation de la MLT ou par un blocage du rappel de la MLT très long à se mettre en place.

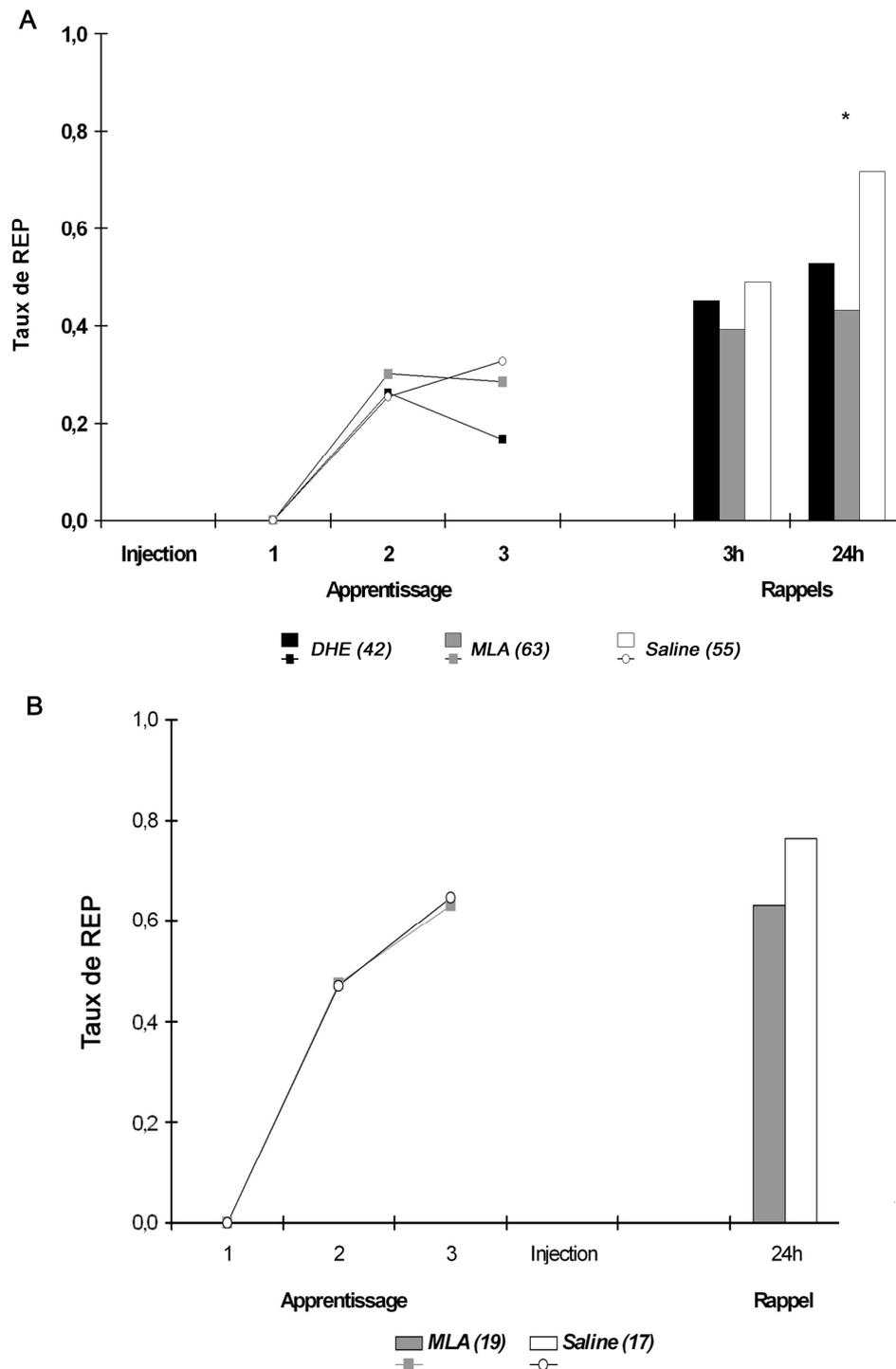


Figure 30 : effets du MLA et de la DHE sur l'apprentissage mécanosensoriel en trois essais. A : injection 15 minutes avant, rappel 3h et 24h après l'acquisition ; **B :** injection immédiatement après, rappel 24h après l'acquisition.

4.2.4. Effet d'une injection de MLA après l'apprentissage

Pour déterminer si le MLA peut affecter la MLT lorsqu'on l'injecte après l'apprentissage, l'expérience précédente a été répliquée dans les mêmes conditions, sauf pour l'injection qui avait lieu cette fois immédiatement après l'apprentissage et le test de rappel qui n'avait lieu qu'une fois, 24 heures plus tard. Cette expérience n'a pas été réalisée avec la DHE, car cette drogue n'affecte pas la MLT. Comme on le voit dans la *figure 30B*, il n'y a aucune différence dans les performances des abeilles traitées au MLA ou à la solution saline, ni avant l'injection (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,999$; 3^{ème} essai : $p = 0,999$) ni après celle-ci (test exact de Fisher, rappel à 24 heures : $p = 0,481$).

Compte tenu de ces résultats, on interprète là encore les effets du MLA comme une inhibition spécifique de la formation de la MLT. En effet, les animaux forment bien une trace mnésique, comme l'indique leur performance à 3 heures ; cependant, la diminution de leur performance 24 heures après l'apprentissage indique un déficit dans la formation de la MLT (voir *figure 30A*). On ne peut pas interpréter cet effet comme un blocage du rappel très long à se mettre en place, car l'injection de MLA 24 heures avant le rappel mais après l'apprentissage n'a pas eu d'effet (*figure 30B*).

4.2.5. Effet du L-NAME

Afin de déterminer si la NO-synthase est impliquée dans l'apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais, du L-NAME (200 μ M volume 0,5 μ l) a été injecté à des abeilles 15 minutes avant un apprentissage en trois essais (suivant le même protocole que pour le MLA et la DHE). Un groupe D-NAME (200 μ M, même volume d'injection) servait de contrôle. Les tests de rappel avaient lieu 3 heures et 24 heures après l'acquisition. La *figure 31* page suivante rapporte les résultats obtenus.

On constate que le L-NAME n'induit pas d'effet durant l'acquisition ou le test de rappel à 3 heures (test exact de Fisher, 2^{ème} essai : $p = 0,842$; 3^{ème} essai : $p = 0,841$; test à 3 heures : $p = 0,142$). Par contre, lors du test à 24 heures, on constate que les abeilles traitées au L-NAME ont eu une performance inférieure à celles qui ont reçu du D-NAME (test exact de Fisher : $p = 0,010$). Il est bien établi que le L-NAME n'inhibe la NO synthase que pendant quelques dizaines de minutes (Müller, 1996). Il est donc exclu que cette drogue puisse avoir un effet très retardé sur le rappel. En suivant le même raisonnement que pour l' α -bungarotoxine et le MLA, on en déduit donc que la synthèse de NO est nécessaire à la formation de la MLT lors d'un apprentissage mécanosensoriel.

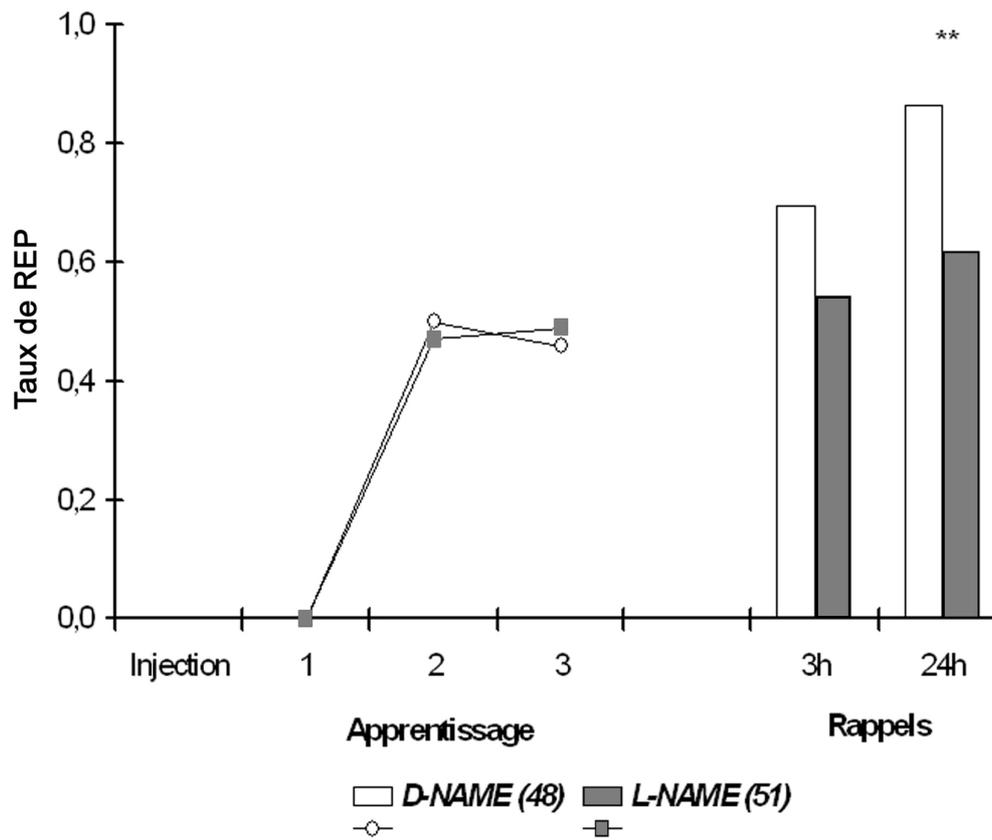


Figure 31 : effets du L-NAME et du D-NAME sur un apprentissage mécanosensoriel en 3 essais. L'injection avait lieu 15 minutes avant l'apprentissage.

5) BILAN DES RÉSULTATS

L'ensemble des résultats rapportés ici sur l'apprentissage et la mémoire est rassemblé dans ce tableau, qui mentionne également les travaux précédents sur l'apprentissage olfactif (Cano Lozano et al., 1996 ; Müller, 1996 ; Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et al., 2001 ; Müller, 2000 ; Gauthier et al., soumis). Le conditionnement mécanosensoriel et le conditionnement olfactif étant affectés de la même façon par les drogues utilisées, ils sont présentés indistinctement.

	Apprentissage en 1 essai			
	Acquisition	Consolidation	Rappel à 3h (MMT)	Rappel à 24h (MMT persistante)
Mécamylamine (10 mM)	---	rien	---	---
DHE (1 mM)	rien	rien	rien	rien
MLA (2 μ M), α -bungarotoxine (1 μ M)	rien	rien	rien	rien
L-NAME (200 μ M)	rien	rien	rien	rien

	Apprentissage en plusieurs essais massés			
	Acquisition et consolidation de la MMT	de la MLT	Rappel à 3h (MMT)	Rappel à 24h (MLT précoce)
Mécamylamine (10 mM)	rien	rien	---	---
DHE (1 mM)	rien	rien	rien	rien
MLA (2 μ M), α -bungarotoxine (1 μ M)	rien	---	rien	rien
L-NAME (200 μ M)	rien	---	rien	rien

Ces résultats ne sont bien sûr valables que dans nos conditions expérimentales (volume injecté, concentrations des drogues, mode d'injection ...). En particulier, les résultats pour le conditionnement en plusieurs essais ne portent que sur l'apprentissage massé (et pas sur le distribué), donc on ne peut pas savoir si les effets sur la MLT précoce (formée après l'apprentissage massé) se retrouveraient sur la MLT tardive (formée après l'apprentissage distribué).

DISCUSSION

L'apprentissage mécanosensoriel

L'apprentissage antennaire mécanosensoriel a fait l'objet de peu d'études. De ce fait, les résultats présentés dans ce travail apportent plusieurs **informations utiles** à son sujet. L'apprentissage mécanosensoriel en un essai conduit à une trace mnésique stable pendant au moins trois jours. Effectuer un apprentissage en plusieurs essais n'améliore pas la performance, et il n'y a d'ailleurs pas non plus de différences entre un apprentissage massé et un apprentissage distribué. La vision traditionnelle « apprentissage en un essai → MMT à 3 heures → oubli à 24 heures » et « apprentissage en trois essais → MMT à 3 heures → MLT à 24 heures » (Müller, 1996 ; Menzel, 1999 ; Menzel et Giurfa, 2001) n'est pas toujours exacte. Il est possible après un apprentissage en un essai de former une « **MMT persistante** » qui permet aux abeilles de se souvenir de la tâche apprise pendant au moins 24 heures. On ne sait pas encore quels sont les supports neurobiologiques de cette « MMT persistante », ni pourquoi elle dépend du stimulus appris. Toutefois, les résultats obtenus ici indiquent que cette forme de mémoire est indépendante de la MLT, car ces deux mémoires n'ont pas les mêmes supports neurobiologiques (voir ci-dessous). La dissociation entre MLT et MMT demeure donc pertinente, car les processus qui sous-tendent ces phénomènes sont distincts. Pour les mêmes raisons, l'obtention de performances similaires après un apprentissage massé et un apprentissage distribué n'implique pas que les systèmes de mémoire sous-tendant ces performances soient les mêmes.

La spécificité des effets des drogues sur la mémoire

Effets des drogues sur la sensibilité au sucre

Des concentrations élevées d'antagonistes nicotiniques diminuent la proportion d'abeilles répondant à une concentration de 30% de solution sucrée et affectent également la sensibilité au sucre. Ces résultats sont cohérents avec les observations de Thany et Gauthier (2005) qui rapportent que la nicotine augmente la sensibilité au sucre. L'imidaclopride (agoniste nicotinique), a par contre un effet négatif sur ce paramètre (Lambin et al., 2001). Comme une interférence avec les voies nicotiniques par le biais d'un antagoniste ou d'un agoniste affecte la sensibilité des abeilles au sucre, on conclue que **les voies nicotiniques sont impliquées dans le traitement de l'information gustative**. Cependant, étant donné que les animaux traités répondaient moins que les témoins à la plus forte concentration en sucre, on ne peut pas exclure

que la perception du sucre ou le REP lui-même soit également affectés, d'autant plus que certaines concentrations affectent fortement les animaux et que des doses élevées de drogues nicotiniques tuent les insectes.

Les concentrations d'antagonistes nicotiniques utilisées pour étudier la mémoire ont été choisies de telle sorte qu'elles n'affectent pas la sensibilité au sucre, sa perception ou la mobilité du proboscis. Il n'est donc pas possible d'interpréter les effets des drogues nicotiniques sur la mémoire par une altération de la perception du sucre.

Effets sur d'autres paramètres comportementaux

Aux concentrations utilisées lors de l'apprentissage, la mécamylamine et l' α -bungarotoxine **n'affectent pas la mobilité des antennes** des abeilles dans nos conditions expérimentales. Cependant, il serait utile de répliquer cette expérience et de vérifier les effets d'autres concentrations et d'autres drogues sur ce paramètre, afin de pouvoir (comme pour le sucre) définir des concentrations à ne pas dépasser. Il serait également intéressant de quantifier les mouvements antennaires spontanés en dehors d'une situation où les antennes entrent en contact avec un stimulus quelconque. Il est possible de filmer les mouvements d'antennes d'animaux témoins ou traités avec des drogues nicotiniques et d'utiliser l'analyse automatisée de ces films telle qu'elle a été mise au point par Lambin et al. (2005). Ce type d'analyse est plus fin que le simple décompte des contacts antennaire sur la plaque métallique.

Quoiqu'il en soit, **il est peu probable que les drogues utilisées aient eu un effet sur la mobilité des antennes ou sur la perception de la plaque métallique**. En effet, un tel effet aurait été systématique et aurait par exemple bloqué le rappel de la trace mnésique en empêchant l'abeille de percevoir la plaque. Comme la seule drogue qui affecte le rappel est la mécamylamine, la DHE, le MLA et l' α -bungarotoxine n'ont pas d'effet sur la perception mécanosensorielle ou les mouvements d'antennes aux concentrations utilisées. Quant à la mécamylamine, elle n'a pas bloqué la formation de la mémoire lorsqu'elle a été injectée avant un apprentissage mécanosensoriel en plusieurs essais ; elle ne bloque pas non plus ces processus.

Enfin, un bon argument en faveur de la spécificité des effets des antagonistes nicotiniques sur la mémoire est la reproductibilité de ces effets avec d'autres antagonistes. En effet, le MLA a les mêmes effets que l' α -bungarotoxine sur la formation de la MLT, tandis que l'hexaméthonium a les mêmes effets que la mécamylamine sur l'apprentissage olfactif en un seul essai (Cano Lozano, 1997). De plus, le fait que des drogues connues *in vivo* et chez le vertébré pour être des antagonistes nicotiniques aient les mêmes effets suggèrent qu'elles se fixent bien sur des récepteurs nicotiniques et non pas de façon aspécifique sur d'autres types de récepteurs.

L' α -bungarotoxine est une protéine d'un poids moléculaire assez élevé (plus de 8000 Da). A ce titre, elle pourrait être soit digérée (clivée en plusieurs peptides) dans l'hémolymphe de l'abeille avant d'atteindre sa cible, soit mettre très longtemps à diffuser vers elle. Une expérience réalisée dans notre équipe exclue une dégradation dans l'hémolymphe : en effet, tant l'injection d' α -bungarotoxine seule que l'injection d' α -bungarotoxine et d'hémolymphe prélevée dans la capsule céphalique bloque la jonction nerf/muscle de la grenouille et la contraction musculaire (Déglise et Barbara, résultats non publiés). Ceci indique que l' α -bungarotoxine conserve ses propriétés dans l'hémolymphe. De plus, l' α -bungarotoxine injectée 10 minutes seulement avant un apprentissage mécanosensoriel en cinq essais suffit à bloquer la formation de la MLT ; en dépit de son poids moléculaire élevé, elle diffuse suffisamment vite pour pouvoir manifester ses effets.

La DHE n'a pas eu d'effet sur l'apprentissage dans nos expériences. Étant donné que chez les vertébrés elle a sensiblement les mêmes propriétés pharmacologiques que la mécamylamine (Sharples et Wonnacott, 2001), il était attendu que la DHE reproduirait ses effets. Les expériences menées au laboratoire ont montré que la DHE induisait un blocage transitoire du rappel à court terme de l'information olfactive (Gauthier et Monneris, données non publiées). Le rôle de la DHE ne pourra être compris que lorsque des études moléculaires et cellulaires auront précisé à quel type de récepteur elle se lie.

Rôle des récepteurs nicotiques dans la mémoire de l'abeille

Une dissociation pharmacologique

L'une des premières conclusions que l'on peut tirer des résultats rapportés ici est que l'apprentissage mécanosensoriel et l'apprentissage olfactif reposent sur les mêmes bases neurobiologiques, au moins en ce qui concerne les voies nicotiques. En effet, les drogues utilisées affectent de façon similaire ces deux apprentissages, indiquant que leurs effets ne sont pas liés à une modalité sensorielle ; de ce fait, on peut supposer l'existence d'une **mémoire associative générale** chez l'abeille, plutôt que de plusieurs formes de mémoires chacune spécifique d'une modalité sensorielle en particulier. Les voies cholinergiques et le NO joueraient donc un rôle dans différentes formes d'apprentissage associatif chez l'abeille.

Par ailleurs, il est clair que les drogues employées se classent dans deux catégories lorsqu'on les emploie dans nos conditions expérimentales (concentrations, volumes, mode d'injection) :

1) celles qui affectent des processus mnésiques qui ne reposent que sur une seule stimulation, c'est-à-dire le **rappel** et l'**apprentissage en un seul essai**. Il s'agit de la **mécamylamine**, mais aussi de l'hexaméthonium pour l'apprentissage olfactif (Cano Lozano et al., 1996 ; Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et al., 2001).

2) celles qui ne jouent un rôle que lorsque plusieurs stimulations sont mises en œuvre, c'est-à-dire au cours de la **formation de la MLT** lors de l'apprentissage en plusieurs essais. Il s'agit de l' **α -bungarotoxine**, du **MLA** et du **L-NAME**, mais aussi d'autres inhibiteurs de la synthèse de NO (Müller, 1996), ainsi que des protéines kinases et des nucléotides cycliques (Müller et Hildebrandt, 1995 ; Fiala et al., 1999 ; Müller, 2000 ; Müller et Hildebrandt, 2002).

Aux concentrations de drogues utilisées, il y a donc clairement une **dissociation pharmacologique** entre deux séries de processus : la mécamylamine agit sur les processus qui ne sont pas affectés par le MLA et l' α -bungarotoxine (apprentissage en un essai, rappel), et le MLA et l' α -bungarotoxine (mais pas la mécamylamine) empêchent la formation de la MLT. On ne peut toutefois donner cette conclusion que pour la MLT précoce (formée après un apprentissage massé), car l'apprentissage distribué n'a pas été étudié lors de ce travail ; toutefois, par commodité, on emploiera le terme MLT dans cette discussion.

Cette dissociation implique que les drogues utilisées ont des **cibles fonctionnellement distinctes** : les récepteurs nicotiques bloqués par la mécamylamine ne sont pas affectés par le MLA et vice-versa. Cette dissociation pharmacologique permettant de distinguer différentes formes de mémoires a déjà été décrite chez l'abeille (Müller, 1996, 2000) et d'autres invertébrés, par exemple chez la seiche (Bellanger et al., 2003), la limnée (Lukowiak et al., 2003) et la drosophile (Isabel et al., 2004).

Par contre, une dissociation pharmacologique n'est pas observée lors des expériences impliquant la sensibilité au sucre. Ceci peut s'expliquer de différentes façons. A des concentrations élevées (telles que celles qui ont des effets sur la perception du sucre), les drogues pourraient perdre leur spécificité pour le récepteur nicotinique qu'elles ciblent : dans ces conditions, elles seraient capables d'affecter tous les récepteurs nicotiques et il devient donc impossible d'observer une dissociation. Alternativement, un seul récepteur nicotinique sensible à toutes les drogues pourrait être impliqué.

Existence de plusieurs types de récepteurs nicotiques

L'existence d'une dissociation pharmacologique lors de l'apprentissage étant bien assurée par nos résultats, il reste à expliquer pourquoi selon la drogue utilisée on n'affecte pas les mêmes récepteurs nicotiques. Une explication à la fois simple et élégante propose l'existence de plusieurs types différents de récepteurs nicotiques. Nauen et al. (2001) ont mis en évidence plusieurs types de récepteurs nicotiques sur des neurones de lobes antennaires d'abeilles adultes en culture. L'existence de plusieurs récepteurs nicotiques ayant des propriétés fonctionnelles différentes a également été proposée suite à des expériences de pharmacologie comportementale mettant en jeu l'habituation du REP (Guez et al., 2001 ; Guez et al., 2003) et le conditionnement olfactif (Gauthier et al., soumis). L'affinité des antagonistes nicotiques serait spécifique du récepteur considéré : ceci expliquerait qu'une partie des récepteurs seulement soit affectée par un antagoniste donné, ce qui permet d'observer des dissociations fonctionnelles.

Lien entre récepteurs nicotiques et NO-synthase

Il reste alors à expliquer pourquoi les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine et au MLA ont le même rôle que la NO-synthase dans la formation de la MLT. Il est déjà bien établi que la NO-synthase de l'abeille est activée par le calcium (Müller, 1994). Or, la stimulation de récepteurs nicotiques sensibles à l' α -bungarotoxine provoque une entrée de calcium dans des cellules de Kenyon en culture obtenues à partir de cerveaux de nymphes d'abeilles (Bicker et Kreissl, 1994 ; Bicker, 1996 ; Goldberg et al., 1999) ; en particulier, Bicker (1996) a indiqué que la stimulation par l'acétylcholine et la nicotine de ces cellules chez l'abeille et le criquet provoquait une entrée de calcium qui stimulait la production de NO par la NO-synthase. L' α -bungarotoxine bloquait cette entrée de calcium et donc empêchait la formation de NO. Des résultats similaires ont été obtenus chez le papillon *Manduca sexta* (Zayas et al., 2002). Associées aux résultats de pharmacologie comportementale discutés ici, ces observations à l'échelle cellulaire indiquent que **la stimulation répétée des récepteurs nicotiques sensibles à l' α -bungarotoxine** lors d'un apprentissage en plusieurs essais induit une **entrée de Ca^{2+}** dans la cellule ; cette entrée de Ca^{2+} **active la NO synthase**. Toutefois, dépolariser la cellule avec des ions K^+ provoque également un influx de Ca^{2+} dans la cellule qui n'est pas bloqué par l' α -bungarotoxine : ceci indique que le calcium peut également pénétrer dans la cellule par le biais de canaux calciques voltage-dépendants (Bicker et Kreissl, 1994 ; Bicker, 1996). Aussi, l'entrée de Ca^{2+} qui relie le récepteur nicotique à la NO synthase ne se fait pas

nécessairement à travers le récepteur nicotinique lui-même. Le rôle exact du calcium dans **le couplage entre récepteurs nicotiniques et NO synthase demeure donc mal connu.**

Les différences entre récepteurs

Les différences entre les récepteurs sensibles et insensibles à l' α -bungarotoxine et au MLA proviendraient de leur **composition en sous-unités**. Cette hypothèse est fermement supportée par plusieurs résultats expérimentaux.

En effet, il est bien connu que chez le vertébré l'affinité des antagonistes nicotiniques pour un récepteur donné dépend des sous-unités composant ce récepteur (Paterson et Nordberg, 2000 ; Sharples et Wonnacott, 2001 ; Karlin, 2002). Par exemple, les récepteurs constitués par la sous-unité $\alpha 7$ sont affectés de façon très spécifique par l' α -bungarotoxine et le MLA, tandis que d'autres récepteurs sont très sensibles à la mécamylamine mais très peu affectés par l' α -bungarotoxine et le MLA. Il paraît vraisemblable que les effets comportementaux différents des antagonistes nicotiniques chez l'abeille puissent être imputés au blocage de récepteurs différant par leur composition en sous-unités ; cette hypothèse a déjà été formulée pour expliquer la toxicité de différents insecticides ciblant les voies nicotiniques (Tomizawa et Casida, 2001, 2003).

Chez d'autres insectes comme la blatte *Periplaneta americana* (Buckingham et al., 1997 ; Courjaret et Lapied, 2001 ; Salgado et Saar, 2004), le papillon *Manduca sexta* (Fickbohm et Trimmer, 2003) et la drosophile (Lansdell et Millar, 2000 ; Zhang et al., 2004) des récepteurs nicotiniques dont la sensibilité à l' α -bungarotoxine varie ont été décrits. Chez *Manduca sexta* et la drosophile, on a montré que cette différence de sensibilité des récepteurs dépend des sous-unités qui les composent. L'abeille exprimant plusieurs sous-unités nicotiniques (Thany et al., 2003 ; Thany et al., 2005), il est plausible que plusieurs types de récepteurs nicotiniques soient présents dans son système nerveux. Certains de ces récepteurs seraient sensibles à l' α -bungarotoxine et d'autres y seraient insensibles. Les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine seraient également sensibles au MLA, comme ceux des vertébrés, et seraient impliqués spécifiquement dans la formation de la MLT lors d'apprentissages en plusieurs essais.

Chez les vertébrés, les récepteurs sensibles à ces deux drogues sont formés de sous-unités $\alpha 7$. Or, cette sous-unité est phylogénétiquement assez ancienne et proche des sous-unités $\alpha 7$ d'insectes, car elle est apparue avant la séparation des arthropodes et des vertébrés (Le Novère et Changeux, 1995 ; Ortells et Lunt, 1995 ; Tsunoyama et Gojobori, 1998 ; Gundelfinger et Schulz, 2000 ; Le Novère et al., 2002 ; Sattelle et al., 2005). Il

existe chez l'abeille deux sous-unités α particulières, ces sous-unités sont homologues de la sous-unité $\alpha 7$ humaine (pourcentage d'homologie 76% et 55% respectivement) et elles ont donc été nommées Apis- $\alpha 7$ -1 et Apis- $\alpha 7$ -2 (Thany et al., 2005). Du fait de leur homologie avec les sous-unités de mammifères, il est vraisemblable que ces deux sous-unités $\alpha 7$ d'abeilles puissent former des récepteurs $\alpha 7$ proches de ceux formés par les vertébrés. Il est donc probable qu'elles partagent des propriétés communes. En particulier, l'existence d'une relation entre les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ (sensibles à l' α -bungarotoxine) et la NO-synthase via l'entrée de calcium dans la cellule a déjà été décrite chez les vertébrés (Vijayaraghavan et al., 1992 ; Rathouz et al., 1996 ; Adams et Stevens, 1998 ; Smith et al., 1998 ; Adams et al., 2000 ; Shoop et al., 2001 ; Si et Lee, 2001 ; Haberberger et al., 2003).

Proposition et discussion d'un modèle explicatif

Ces explications peuvent être résumées dans un modèle (*figure 32*) :

- Au cours d'un apprentissage en un seul essai ou d'un test de rappel, il n'y a qu'une stimulation et le transfert de l'information nécessite un récepteur nicotinique sensible à la mécamylamine, mais insensible à l' α -bungarotoxine ou au MLA.
- Par contre, au cours d'un apprentissage en plusieurs essais, un récepteur sensible à l' α -bungarotoxine ou au MLA (mais pas à la mécamylamine) est mis en jeu. Ce récepteur détecterait spécifiquement l'occurrence de plusieurs stimulations et pourrait être composé de sous-unités Apis- $\alpha 7$. Naturellement, le récepteur sensible à la mécamylamine est lui aussi stimulé par l'acétylcholine lors de l'apprentissage en plusieurs essais, mais il ne joue pas un rôle indispensable. Le blocage du récepteur sensible à l' α -bungarotoxine ou au MLA au cours d'un apprentissage en plusieurs essais empêche la formation de la MLT (au même titre que l'inhibition de la production de NO à l'aide de L-NAME), mais comme la MMT disparaît sans être remplacée par la MLT, la performance des animaux diminue 24 heures après l'apprentissage. La stimulation de ce récepteur induit une entrée de calcium dans la cellule qui stimule la NO-synthase, aboutissant ainsi à la production de NO. Celui-ci peut agir soit dans le neurone où il est formé, soit diffuser vers les cellules adjacentes (cellules gliales ou neurones).

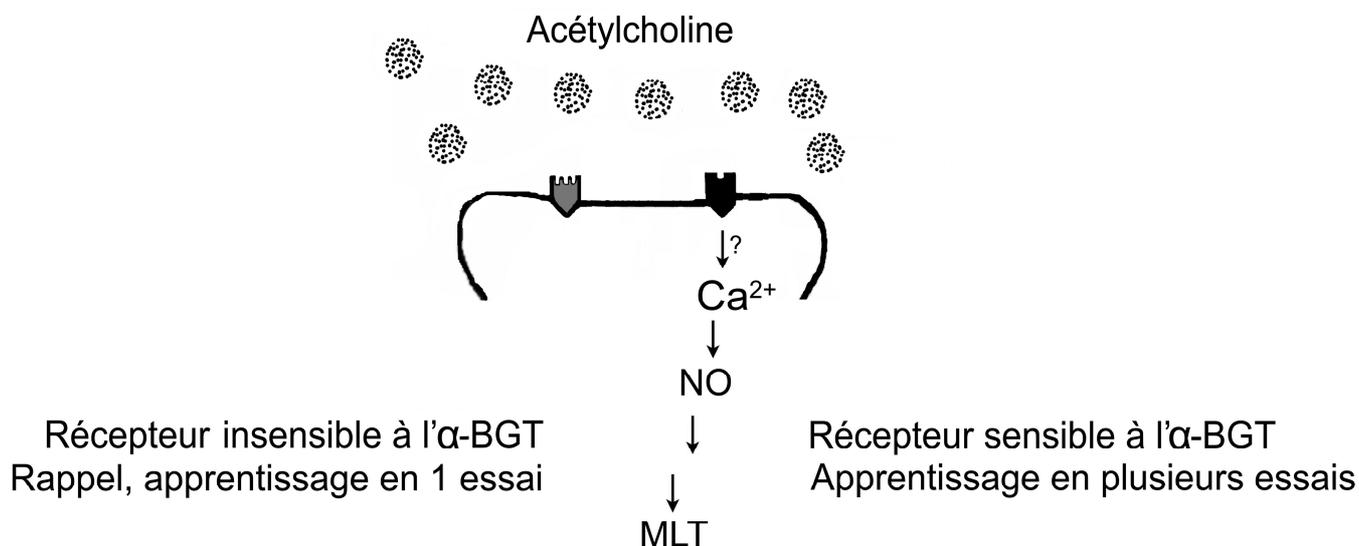


Figure 32: Le modèle proposé. Bien que les récepteurs soient représentés côte à côte par commodité, on ne sait pas s'ils s'expriment dans les mêmes cellules (ou dans les mêmes tissus), ou s'ils sont pré- ou post-synaptiques. α-BGT : α-bungarotoxine.

Évidemment **un certain nombre de points importants restent à vérifier**, et la *figure 32* est essentiellement une hypothèse de travail destinée à résumer les informations connues à ce jour et à orienter des travaux futurs. En particulier, on ne sait pas pourquoi les récepteurs sensibles à l'α-bungarotoxine auraient besoin de **plusieurs stimulations pour être activés**. Une explication pourrait être que ces récepteurs sont **initialement non fonctionnels**, et qu'une première stimulation est nécessaire pour induire leur état actif : ceci expliquerait pourquoi ils ne détecteraient que des stimulations répétées. Mais on ne dispose pas à ce jour d'indications sur la façon dont ces récepteurs passeraient d'un état fonctionnel à un état non fonctionnel ; il est possible qu'ils soient initialement inactivés par phosphorylation, et qu'ils soient déphosphorylés lors de l'apprentissage en plusieurs essais, passant ainsi sous une forme active (Courjaret et Lapied, 2001 ; Courjaret et al., 2003). On peut aussi imaginer une **activation en deux temps**.

Alternativement, il est possible que ces récepteurs nécessitent davantage d'acétylcholine pour être activés : ceci est plausible si effectivement ces récepteurs ressemblent aux récepteurs α7 de vertébrés, car ceux-ci ont une **faible affinité pour l'acétylcholine** (Sharples et Wonnacott, 2001). Dans ce cas, l'apprentissage en plusieurs essais se traduirait par une accumulation d'acétylcholine, si bien que la quantité de neurotransmetteur libéré finirait par être suffisante pour activer le récepteur. Ceci implique que l'acétylcholine s'accumule dans la fente synaptique sans être dégradée par l'acétylcholinestérase, ce qui est peu probable. Bien que Gauthier et al. (1992) aient rapporté

que l'activité de cette enzyme diminuait au cours de l'apprentissage, par la suite les mêmes auteurs (Fresquet et al., 1998) ne sont pas parvenus à reproduire ce résultat avec une technique de mesure plus sensible. Enfin, il est possible que ces récepteurs soient tout simplement **peu exprimés** dans les neurones, si bien que les effets de leur activation ne deviendraient manifestes qu'au bout de plusieurs stimulations.

Par ailleurs, **d'autres neurotransmetteurs** sont impliqués dans le rappel chez l'abeille : le glutamate semble ainsi être impliqué dans le rappel de la MLT (Maleszka et al., 2000 ; Si et al., 2004). De plus, les amines biogènes jouent probablement un rôle important, car elles supportent l'information liée à la récompense sucrée (Mercer et Menzel, 1982 ; Hammer, 1993, 1997 ; Hammer et Menzel, 1998 ; Menzel et al., 1999 ; Scheiner, 2001 ; Scheiner et al., 2002 ; Scheiner et al., 2003b) ; en particulier, l'octopamine active la protéine kinase A (Hildebrandt et Müller, 1995a ; Scheiner et al., 2003b), et on sait d'autre part que le NO génère la production de GMP cyclique, qui active également la protéine kinase A (Müller, 2000). Celle-ci pourrait donc être le point de convergence moléculaire des informations portées par l'acétylcholine (stimulus appris : odeur ou plaque métallique) et l'octopamine (récompense sucrée).

La cohérence avec l'électrophysiologie

Le principal problème que soulève l'hypothèse de l'existence de plusieurs récepteurs nicotiques différant par leur sensibilité pour les antagonistes est que ce résultat n'est **pas cohérent avec les données obtenues en électrophysiologie**. En effet, la mécamylamine, le MLA, la DHE et l' α -bungarotoxine sont des inhibiteurs puissants des courants nicotiques enregistrés dans des neurones de nymphes en culture par la technique de patch-clamp (Goldberg et al., 1999 ; Déglise et al., 2002 ; Wüstenberg et Grünwald, 2004 ; Barbara et al., 2005). Le MLA, la mécamylamine et la DHE bloquent complètement les courants induits par l'acétylcholine et ne discriminent pas entre plusieurs sous-types de récepteurs nicotiques, tant dans les cellules de Kenyon (Wüstenberg et Grünwald, 2004) que dans celles obtenues à partir du lobe antennaire (Barbara et al., 2005). De même, ces courants cholinergiques sont affectés par l' α -bungarotoxine : Déglise et al. (2002) ont rapporté un blocage total des courants cholinergiques dans les cellules de Kenyon, tandis que Goldberg et al. (1999) n'ont trouvé qu'un blocage partiel (80%), ce qui semble également être le cas dans les lobes antennaires (Barbara et al., 2005). Il n'y a donc qu'une seule population de récepteurs nicotiques dans les neurones de nymphes d'abeille en culture.

Il y a donc clairement une différence entre les effets de l' α -bungarotoxine, de la mécamylamine, du MLA et de la DHE sur des cellules de nymphe en culture et *in vivo* chez

l'adulte : une dissociation pharmacologique n'est observée que dans le second cas. On peut expliquer la différence entre les résultats de la pharmacologie comportementale et ceux de l'électrophysiologie par une **différence dans l'expression des sous-unités nicotiques au cours du développement**. En effet, tous les enregistrements de récepteurs nicotiques obtenus en électrophysiologie concernaient des cellules de nymphes tandis que ce sont des abeilles adultes qui ont été utilisées dans les expériences rapportées ici. Il est probable que les cellules de nymphes n'expriment pas les mêmes récepteurs que ceux que l'on trouve chez des abeilles adultes ; plusieurs arguments vont dans le sens de cette explication. Ainsi, les travaux de Guez et al. (2001 ; 2003) ont suggéré l'existence de deux types distincts de récepteurs nicotiques chez l'abeille ; ces récepteurs n'auraient pas la même affinité pour l'imidaclopride (agoniste nicotinique) et seraient exprimés à des moments différents de la vie de l'abeille. Ces résultats vont dans le sens d'un **changement dans l'expression des récepteurs nicotiques** dans le cerveau de l'abeille **en fonction du temps**. Dans ces conditions, il est tout à fait envisageable que le profil pharmacologique des récepteurs nicotiques exprimés chez les nymphes ne soit pas le même que celui observé chez l'adulte. Nauen et al. (2001) ont observé qu'il existe au moins deux sous populations de récepteurs nicotiques dans des neurones cultivés à partir de lobes antennaires d'abeilles adultes. Ceci est une indication directe que les cellules de nymphes et les cellules d'adultes ont des propriétés différentes.

Les sous-unités Apis- $\alpha 7$ font probablement partie des récepteurs nicotiques sensibles à l' α -bungarotoxine et au MLA. Thany et al. (2005) ont indiqué que bien que la sous-unité Apis- $\alpha 7$ -2 soit exprimée dans les cellules de Kenyon de type II des nymphes et des adultes, la sous-unité Apis- $\alpha 7$ -1 n'apparaît qu'à l'âge adulte, et uniquement dans les cellules de Kenyon de type I, ce qui conforte l'idée d'une évolution des récepteurs nicotiques formés avec l'âge. De ce fait, les différences entre les résultats de pharmacologie comportementale et les résultats des enregistrements électrophysiologiques pourraient provenir du fait que ces derniers ont été obtenus sur des cellules de nymphes ; ils ne sont donc pas forcément pertinents pour interpréter les performances d'abeilles adultes.

Compte tenu du rôle des récepteurs nicotiques dans la mémoire, une évolution de leur expression au cours de la vie de l'abeille devrait se traduire par une évolution des performances dans l'apprentissage en fonction de l'âge. Les observations de Ray et Ferneyhough (1997b ; 1999) vont effectivement dans ce sens : seules les abeilles suffisamment âgées apprennent correctement. Leurs performances s'améliorent à l'issue d'un

remaniement des corps pédonculés (Fahrbach et Robinson, 1996), qui pourrait également être l'occasion d'une modification dans l'expression des sous-unités des récepteurs nicotiques.

Perspectives

Neuroanatomie fonctionnelle

Les résultats rapportés ici ont tous été obtenus après des injections dans l'hémolymphe de la tête, c'est-à-dire des injections globales affectant tout le cerveau. Ces expériences pourront être utilement complétées par des injections locales, c'est-à-dire des **injections ciblant des zones précises du cerveau**. Ces zones pourraient par exemple être le lobe α ou les calices des corps pédonculés, le lobe protocérébral, le complexe central, le lobe dorsal ou encore le lobe antennaire. De cette façon, on peut déterminer avec précision les zones du cerveau impliquées dans l'apprentissage et la mémoire. De plus, il est possible que les différents récepteurs nicotiques discutés ici s'expriment dans des zones différentes du cerveau.

Ce type de travail a déjà permis de montrer au cours d'un apprentissage olfactif en un essai que des injections localisées de mécamylamine dans les calices des corps pédonculés bloquent l'acquisition mais pas le rappel, tandis que des injections dans le lobe α bloquent le rappel (Cano Lozano, 1997 ; Cano Lozano et al., 2001). Ces résultats devraient être étendus à l'apprentissage en plusieurs essais, ainsi qu'à l'apprentissage mécanosensoriel ; les effets du MLA et de la nicotine devraient également être étudiés. Les résultats rapportés ici pourront servir de guide à de telles expériences. D'autres zones du cerveau pourraient également être la cible d'injections, en particulier le lobe protocérébral et le deutocérébron ; Thany et Gauthier (2005) ont par exemple déjà montré qu'une injection de nicotine dans le lobe antennaire favorise le rappel d'un apprentissage olfactif.

Bien sûr, les injections locales peuvent également être employées de façon fructueuse pour étudier les **relations des voies cholinergiques avec d'autres cascades cellulaires**. Par exemple, un bon moyen de vérifier le lien entre les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine (et au MLA) et la voie NO/GMPc serait d'injecter dans les calices (par exemple) du MLA et un donneur de NO ou de GMPc : si le NO ou le GMPc interviennent en aval du récepteur nicotinique, alors administrer ces molécules devrait restaurer la perte de MLT provoquée par le MLA. Müller (2000) a déjà employé ce type de traitements combinés avec succès dans le lobe antennaire, sans toutefois s'intéresser aux neurotransmetteurs autres que le NO. Une telle approche permettrait également d'étudier la régulation des récepteurs nicotiques : en effet,

les récepteurs nicotiques insensibles à l' α -bungarotoxine peuvent être modulés par la protéine kinase C dans les neurones DUM de la blatte *Periplaneta americana* (Courjaret et Lapiéd, 2001 ; Courjaret et al., 2003). De même, chez l'aplysie, le NO diminue les courants potassiques induits par l'acétylcholine (Sawada et Ichinose, 1996) et peut selon les synapses considérées augmenter ou diminuer la libération de ce neurotransmetteur (Meulemans et al., 1995).

En dehors du travail de Pribbenow et Erber (1996) sur l'effet des amines biogènes sur les mouvements d'antennes, le rôle des neurotransmetteurs lors des apprentissages mécanosensoriel et olfactif a été assez peu étudié dans le **lobe dorsal**, en dépit du fait que ce neuropile reçoit l'information sucrée, mécanosensorielle et tactile en provenance des antennes. Beaucoup de travaux doivent donc lui être consacrés avant de bien comprendre ses fonctions. Le lobe dorsal traite l'information gustative en provenance des antennes. De nombreux auteurs ont rapporté un rôle dans l'habituation ou la sensibilité au sucre des lobes antennaires (Braun et Bicker, 1992 ; Müller et Hildebrandt, 1995 ; Cano Lozano, 1997 ; Müller et Hildebrandt, 2002 ; Thany et Gauthier, 2005), en dépit du fait que ceux-ci ne reçoivent pas d'informations gustatives (Haupt et Barbara, article en préparation). Il est donc probable que les injections locales qui avaient été faites dans le lobe antennaire au cours de ces travaux aient diffusé vers le lobe dorsal : ces deux neuropiles sont en effet étroitement accolés. Les injections locales ne permettent donc pas vraiment de distinguer entre le lobe dorsal et le lobe antennaire à cet égard.

Comme indiqué précédemment, les ARNm des différentes sous-unités des récepteurs nicotiques peuvent être localisées dans le cerveau de l'abeille à l'aide d'hybridations *in situ* qui permettent d'identifier les zones du cerveau où elles s'expriment. Le pendant fonctionnel de cette technique consisterait à injecter dans des zones précises du cerveau des abeilles des **ARN interférants**. L'ARN interférant est un ARN simple brin dont la séquence s'apparie à celle d'un brin d'ARN messenger codant exprimé dans le neurone. Le résultat de cet appariement est un ARN double brin non fonctionnel qui est détruit par la cellule sans avoir pu mener à la synthèse de la protéine qu'il code. Des ARN interférants permettraient donc de bloquer spécifiquement la synthèse des sous-unités auxquelles ils correspondent. De tels ARN seraient injectés dans les neuropiles du cerveau où l'hybridation *in-situ* aurait indiqué l'expression des sous-unités en question, puis les performances mnésiques des abeilles traitées seraient évaluées. Dans le cadre du modèle présenté ci-dessus, on peut prévoir que le blocage de l'expression des sous-unités Apis- α 7-1 et Apis- α 7-2 (qui entreraient dans la composition des récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine et au MLA) empêcherait la formation de la

MLT. Enfin, ce genre d'expérience pourrait tirer profit des possibilités de manipulations génétiques offertes par la drosophile, qui exprime également une sous-unité de type $\alpha 7$ ($D\alpha 7$). On pourrait par exemple vérifier si la MLT peut encore se former chez des drosophiles dépourvues de cette sous-unité ou chez qui on l'empêche d'être exprimée.

Aspects cellulaires et moléculaires

Les travaux rapportés ici, pour être complètement interprétés, nécessitent une connaissance approfondie des récepteurs nicotiques de l'abeille. Une telle connaissance implique plusieurs travaux.

- **Il faut poursuivre l'inventaire des sous-unités composant les récepteurs nicotiques, déterminer leur séquence et les cloner** (obtenir leur ADN). Ce travail a déjà été entamé (Thany et al., 2003 ; Thany et al., 2005). La connaissance des séquences des récepteurs nicotiques permettra également de localiser les zones du cerveau où s'expriment les sous-unités (hybridation *in situ*) et de construire des ARN interférants pour disposer d'un moyen d'affecter spécifiquement les récepteurs comportant une sous-unité donnée.

- Connaître la séquence des sous-unités des récepteurs nicotiques ne suffit pas à connaître la composition en sous-unités des récepteurs eux-mêmes. Cette information peut être obtenue en exprimant l'ARN messager ou l'ADN complémentaire des sous-unités dans des **modèles hétérologues**, c'est à dire des cellules provenant d'une autre espèce et ne comportant pas de récepteurs nicotiques autres que ceux formés par les sous-unités dont on introduit l'ARN ou l'ADN complémentaire. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'étudier les **propriétés pharmacologiques de récepteurs dont la composition en sous-unité est connue** : en effet, comme les cellules utilisées ne comportent pas de récepteurs nicotiques natifs, seuls les récepteurs dont on a introduit l'ARN s'expriment. Toutefois, les nombreux travaux faits à l'aide de ce type de protocole chez d'autres insectes ont nécessité d'exprimer les sous-unités conjointement avec des sous-unités de vertébrés pour obtenir l'expression de récepteurs fonctionnels (Sattelle et al., 2005). Même ainsi, l'un des modèles les plus utilisés, l'ovocyte de xénope, n'a permis d'exprimer des sous-unités Apis- $\alpha 3$ d'abeille que dans des proportions très faibles (Sanchez-Cassou, 2004). Aussi, déterminer les facteurs mis en jeu dans l'assemblage des récepteurs nicotiques au sein des membranes plasmiques de systèmes hétérologues serait essentiel à l'obtention d'un modèle

fiable ; d'autres modèles (cellules S2 de drosophile) permettraient peut être de réussir à exprimer des sous-unités provenant de l'abeille.

- L'étude électrophysiologique **de cellules d'abeilles adultes** par la technique de patch-clamp donnera accès aux propriétés pharmacologiques des récepteurs exprimés dans les cellules d'abeilles. Cette technique est complémentaire de l'expression hétérologue et permet d'étudier les récepteurs qui s'expriment dans les neurones mais dont on ne connaît pas la composition en sous-unités, tandis que l'enregistrement de cellules hétérologues permet de connaître les propriétés de récepteurs de composition connue, mais sans savoir s'ils s'expriment vraiment dans les neurones.

- Enfin, **l'imagerie calcique** pourra être employée pour tester directement certaines des hypothèses émises précédemment. En effet, cette technique peut être appliquée soit à des tissus (on a vu précédemment son intérêt dans l'étude du lobe antennaire), soit à des cellules isolées. Dans les deux cas, il est possible de détecter si la nicotine déclenche un influx de calcium dans le tissu ou la cellule, et si cet influx peut être bloqué par des antagonistes nicotiques. Si les hypothèses proposées ci-dessus se vérifient, on peut prévoir que le MLA ou l' α -bungarotoxine bloquent l'entrée du calcium dans la cellule, ce qui serait cohérent avec plusieurs observations déjà publiées (David et Sattelle, 1990 ; Bicker et Kreissl, 1994 ; Müller et Bicker, 1994 ; Bicker, 1996 ; Goldberg et al., 1999). De plus, il est possible d'utiliser d'autres sondes cellulaires pour enregistrer non pas un signal calcique, mais un signal lié au NO. Ceci permettrait de relier directement les effets des drogues nicotiques à la synthèse de NO, et d'étudier le rôle du calcium dans le couplage entre récepteur nicotinique et NO synthase. Toujours selon nos hypothèses, la nicotine induirait une production de NO qui serait bloquée par l' α -bungarotoxine ou le MLA. Cette observation a déjà été faite dans des cultures de cellules d'abeilles par Bicker (1996), mais aussi chez le papillon *Manduca sexta* par Zayas et al. (2002). Les deux techniques d'imagerie (calcique et du NO) pourraient également s'appliquer aux cellules hétérologues ou même aux tissus de l'abeille en vie.

On constate donc que seule la conjonction de différentes techniques (biologie moléculaire, enregistrement en patch clamp sur cellule cultivée ou hétérologue, imagerie calcique de cellules et de tissus) permettra de tester les hypothèses proposées ci-dessus.

L'ensemble de ces travaux pourra être guidé par le modèle présenté ci-dessus et permettra de le faire évoluer. En particulier, deux points essentiels sont de comprendre pourquoi les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine ne réagissent qu'à plusieurs stimulations et quels mécanismes induisent l'entrée de calcium dans la cellule lors de la formation de la MLT.

En outre, un complément important à tous ces travaux est l'étude des **cascades intracellulaires** se produisant dans les neurones en aval de la production de NO. De telles cascades impliquent le GMP cyclique et des protéines kinases, et bien que plusieurs travaux leur aient été consacrés (Müller, 1996 ; Grunbaum et Müller, 1998 ; Fiala et al., 1999 ; Müller, 2000 ; Müller et Hildebrandt, 2002 ; Lebouille et Muller, 2004), on ne sait pas encore comment la trace mnésique est codée dans la cellule ; il est possible que le facteur de transcription CREB soit impliqué dans un tel codage (Eisenhardt et al., 2003), comme cela semble être le cas chez la drosophile (Perazzona et al., 2004). Quoi qu'il en soit, l'intérêt des résultats rapportés dans ce travail est de relier ces cascades intracellulaires à un neurotransmetteur, l'acétylcholine : les résultats rapportés ici jettent donc un pont entre le niveau intraneuronal (cascades intracellulaires) et le niveau interneuronal (interaction entre neurones).

L'apprentissage mécanosensoriel : une voie à explorer

Ce travail a permis d'approfondir les connaissances sur l'apprentissage mécanosensoriel. Il est cependant clair que cette forme de conditionnement est beaucoup moins connue que le conditionnement olfactif. En particulier, **très peu d'informations sont disponibles sur la plasticité neuronale** mise en jeu lors de cet apprentissage. On ignore par exemple si le neurone VUMmx1 (ou un autre neurone VUM) est impliqué dans la voie de la récompense dans cet apprentissage comme c'est le cas pour l'apprentissage olfactif (Hammer, 1993 ; Hammer et Menzel, 1998). Plus généralement, même si on soupçonne l'implication du lobe dorsal dans ce type d'apprentissage, on ne sait rien de son éventuel rôle et les réseaux neuronaux impliqués sont inconnus. En particulier, on ne sait pas si les corps pédonculés ou d'autres zones du cerveau sont impliqués dans l'apprentissage mécanosensoriel. Les corps pédonculés ne semblent pas recevoir d'informations en provenance du lobe dorsal (Kloppenburg, 1995 ; Haupt et Barbara, article en préparation), mais le fait que le neurone Pe1 (Mauelshagen, 1993 ; Rybak et Menzel, 1998) -qui reçoit des informations dans le pédoncule des corps pédonculés- réponde à des stimulations mécanosensorielles indique que les corps pédonculés reçoivent d'une façon ou d'une autre des informations sur ce type de stimuli. Les travaux rapportés ici et les résultats obtenus par Erber et ses collègues (Pribbenow et Erber, 1996 ; Erber et al., 1997 ; Erber et al., 1998 ; Erber et al., 2000)

constituent donc les premières étapes de nombreuses études. L'une d'entre elles pourraient être la recherche d'un site de convergence entre l'information sucrée et l'information mécanosensoriel ; il est probable qu'il s'agisse du lobe dorsal.

Bien que les résultats rapportés ici traitent en détail des différentes phases de la mémoire mécanosensorielle de l'abeille, tous les processus liés à la plasticité mnésique n'ont pas été étudiés. Ainsi, les processus **d'extinction et de reconsolidation** rapportés lors de l'apprentissage olfactif (Sandoz et Pham-Delègue, 2004 ; Stollhoff et al., 2005) n'ont pas été abordés dans le cadre de ce travail. L'extinction désigne la baisse de la performance d'animaux conditionnés suite à la présentation répétée du stimulus conditionné sans que celui-ci ne soit récompensé. La reconsolidation correspond à une nouvelle phase de consolidation qui suit une nouvelle présentation du stimulus conditionné (par exemple après un rappel ou un nouvel apprentissage survenant après le premier). Ces deux phénomènes peuvent se produire de façon simultanée et concurrente, ce qui n'est pas encore très bien compris. C'est le nombre de tests de rappel consécutifs qui détermine si l'extinction et/ou la reconsolidation se produisent ; comme les récepteurs sensibles à l' α -bungarotoxine sont impliqués spécifiquement lorsqu'il y a plusieurs stimulations, il est possible qu'ils jouent un rôle essentiel dans ces phénomènes.

En outre, du fait de la durée d'effet limitée des drogues nicotiques, les **apprentissages distribués** n'ont pas été étudiés, car ces apprentissages peuvent durer plusieurs dizaines de minutes. Les ARN interférants déjà mentionnés ci-dessus ont une durée d'effet beaucoup plus longue que celle des antagonistes nicotiques et pourraient être utilisés pour étudier ces processus.

D'autre part, ce travail s'est limité à aborder le conditionnement mécanosensoriel du REP, pour approfondir des résultats précédemment obtenus avec le conditionnement olfactif. Cependant, l'étude du conditionnement mécanosensoriel pourrait être complétée en enregistrant non plus seulement le REP, mais aussi les **mouvements d'antennes**, qui sont eux aussi modifiés durant cet apprentissage. **D'autres apprentissages** pourraient également être explorés, en particulier le conditionnement tactile pavlovien (Giurfa et Malun, 2004), la plasticité des mouvements d'antennes (Erber et Schildberger, 1980 ; Erber et al., 1993b ; Erber et al., 1997 ; Lambin et al., 2005) ou le conditionnement aversif de l'extension du dard (Vergoz, 2004), sans parler de toutes les tâches que peuvent apprendre d'autres insectes (notamment les drosophiles) et qui n'ont été ici qu'effleurées ; compte tenu des résultats rapportés ici, il est probable que tous ces apprentissages impliquent les voies cholinergiques.

Enfin, on ne sait pas **si la MLT nécessite la formation de la MMT** pour apparaître, ou si ces deux types de mémoires apparaissent de façon indépendante comme chez la drosophile (Isabel et al., 2004). Une façon d'aborder cette question serait de découvrir une drogue (antagoniste nicotinique ou autre) qui bloquerait spécifiquement la formation de la MMT tout en laissant intacte la MLT lors d'un apprentissage en plusieurs essais. Un tel résultat indiquerait que les deux formes de mémoires sont dissociées.

La nature de la trace mnésique

L'essentiel du travail accompli ici s'est focalisé sur **l'établissement de la trace mnésique** plutôt que sur **son contenu**. En effet, les protocoles d'apprentissages utilisés au cours de ce travail étaient tous élémentaires (association stimulus/stimulus ou stimulus/réponse) ; aucun ne mettait en jeu des associations non élémentaires entre stimuli (Giurfa, 2003). L'étude du rôle des récepteurs nicotiques dans la plasticité mnésique impliquée dans des formes d'apprentissages plus complexes reste donc à faire. Cependant, les performances les plus élaborées de l'abeille se manifestent surtout en vol libre (Giurfa et al., 1996 ; Giurfa et al., 2001 ; Stach et al., 2004). Pour essayer d'expliquer ces performances sophistiquées, il faudra aborder les **bases neurobiologiques des apprentissages** effectués par l'abeille **au cours du butinage et de la navigation**. Comme il n'est pas facile d'injecter une drogue à une abeille sans la fixer, cet objectif nécessitera l'emploi de drogues que les abeilles recevraient dans leur nourriture plutôt que par une injection.

Bien qu'administrer dans des conditions contrôlées un traitement pharmacologique individuel à des abeilles en vol libre pourrait s'avérer difficile à mettre en œuvre, ce type d'expérience constituerait une grande réussite dans l'étude de la neurobiologie des comportements. Les résultats qui sont rapportés dans ce travail constituent un premier pas dans cette direction.

BIBLIOGRAPHIE

Nombre total de références : 336.

- A -

Abel R, Rybak J et Menzel R, 2001. Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 437, page(s) 363-383.

Adams C E et Stevens K E, 1998. Inhibition of nitric oxide synthase disrupts inhibitory gating of auditory responses in rat hippocampus. *J Pharmacol Exp Ther* 287, page(s) 760-765.

Adams C E, Stevens K E, Kem W R et Freedman R, 2000. Inhibition of nitric oxide synthase prevents $\alpha 7$ nicotinic receptor-mediated restoration of inhibitory auditory gating in rat hippocampus. *Brain Res* 877, page(s) 235-244.

Agnisola C, Castaldo P et Fiorito G, 1996. *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) as a model in behavioral pharmacology: a test of handling effects. *Physiol Behav* 59, page(s) 729-733.

Alberini C M, 1999. Genes to remember. *J Exp Biol* 202, page(s) 2887-2891.

Alloway T, 1972. Learning and memory in insects. *Annu Rev Entomol* 17, page(s) 43-56.

Armengaud C, Ait-Oubah J, Causse N et Gauthier M, 2001. Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the Honeybee brain. *Neurosci Lett* 304, page(s) 97-101.

Armengaud C, Causse N, Ait-Oubah J, Ginolhac A et Gauthier M, 2000. Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. *Brain Res* 859, page(s) 390-393.

Armengaud C, Lambin M et Gauthier M, 2002. Effect of imidacloprid on the neural processes of memory in honey bees. *Extrait de "Honey bees: estimating the environmental impact of chemicals", coordonné par J Devillers et M Pham-Delègue et publié par Taylor & Francis, page(s) 85-100.*

- B -

Barbara G, Zube C, Rybak J, Gauthier M et Grünewald B, 2005. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A, impression en cours.*

Bellanger C, Dauphin F, Belzunces L P, Cancian C et Chichery R, 1997. Central acetylcholine synthesis and catabolism activities in the cuttlefish during aging. *Brain Res* 762, page(s) 219-222.

Bellanger C, Dauphin F, Belzunces L P et Chichery R, 1998. Parallel regional quantification of choline acetyltransferase and cholinesterase activity in the central nervous system of an invertebrate (*Sepia officinalis*). *Brain Res Brain Res Protoc* 3, page(s) 68-75.

Bellanger C, Dauphin F, Chichery M P et Chichery R, 2003. Changes in cholinergic enzyme activities in the cuttlefish brain during memory formation. *Physiol Behav* 79, page(s) 749-756.

Benjamin P R, Staras K et Kemenes G, 2000. A systems approach to the cellular analysis of associative learning in the pond snail *Lymnaea*. *Learn Mem* 7, page(s) 124-131.

Bentley P, Husain M et Dolan R J, 2004. Effects of cholinergic enhancement on visual stimulation, spatial attention, and spatial working memory. *Neuron* 41, page(s) 969-982.

Beron de Astrada M et Maldonado H, 1999. Two related forms of long-term habituation in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* 63, page(s) 109-118.

Bhagavan S et Smith B H, 1997. Olfactory conditioning in the honey bee, *Apis mellifera*: effects of odor intensity. *Physiol Behav* 61, page(s) 107-117.

Bicker G, 1996. Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. *J Neurosci Methods* 69, page(s) 33-41.

-----, 1998. NO news from insect brains. *Trends Neurosci* 21, page(s) 349-355.

-----, 1999. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc Res Tech* 45, page(s) 174-183.

-----, 2001. Sources and targets of nitric oxide signalling in insect nervous systems. *Cell Tissue Res* 303, page(s) 137-146.

Bicker G et Hahnlein I, 1994. Long-term habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *Neuroreport* 6, page(s) 54-56.

Bicker G et Kreissl S, 1994. Calcium imaging reveals nicotinic acetylcholine receptors on cultured mushroom body neurons. *J Neurophysiol* 71, page(s) 808-810.

Bitterman M, 1988. Vertebrate-Invertebrate comparisons. *Extrait de "Intelligence and evolutionary biology"*, coordonné par H Jerison et D Jerrison et publié par Springer-Verlag, page(s) 251-275.

-----, 1996. Comparative analysis of learning in honeybees. *Anim learn behav* 24, page(s) 123-141.

Bitterman M E, Menzel R, Fietz A et Schafer S, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 97, page(s) 107-119.

Blenau W et Baumann A, 2001. Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* 48, page(s) 13-38.

Blenau W et Erber J, 1998. Behavioural pharmacology of dopamine, serotonin and putative aminergic ligands in the mushroom bodies of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Brain Res* 96, page(s) 115-124.

Brandes C et Menzel R, 1990. Common mechanisms in proboscis extension conditioning and visual learning revealed by genetic selection in honeybees (*Apis mellifera capensis*). *J Comp Physiol A* 166, page(s) 545-552.

Braun G et Bicker G, 1992. Habituation of an appetitive reflex in the honeybee. *J Neurophysiol* 67, page(s) 588-598.

Brembs B, 2003. Operant conditioning in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 13, page(s) 710-717.

Brembs B, Lorenzetti F D, Reyes F D, Baxter D A et Byrne J H, 2002. Operant reward learning in *Aplysia*: neuronal correlates and mechanisms. *Science* 296, page(s) 1706-1709.

Bshary R, Wickler W et Fricke H, 2002. Fish cognition: a primate's eye view. *Anim Cogn* 5, page(s) 1-13.

Buckbee D et Abramson C, 1997. Identification of a new contingency-based response in honeybees (*Apis mellifera*) through revision of the proboscis extension conditioning paradigm. *J insect behav* 10, page(s) 479-491.

Buckingham S, Lapied B, Corronc H et Sattelle F, 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200, page(s) 2685-2692.

Burrell B D et Sahley C L, 2001. Learning in simple systems. *Curr Opin Neurobiol* 11, page(s) 757-764.

- C -

Cahill L, McGaugh J L et Weinberger N M, 2001. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci* 24, page(s) 578-581.

Cano Lozano V, 1997. Etude du rôle du système cholinergique dans les processus de mémorisation chez l'abeille. *Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III.*

Cano Lozano V, Armengaud C et Gauthier M, 2001. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J Comp Physiol A 187, page(s) 249-254.*

Cano Lozano V, Bonnard E, Gauthier M et Richard D, 1996. Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. *Behav Brain Res 81, page(s) 215-222.*

Cano Lozano V et Gauthier M, 1998. Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacol Biochem Behav 59, page(s) 903-907.*

Carew T J, Walters E T et Kandel E R, 1981. Classical conditioning in a single withdrawal reflex in *Aplysia californica*. *J Neurosci 1, 1426-1437.*

Cayre M, Buckingham S D, Yagodin S et Sattelle D B, 1999. Cultured insect mushroom body neurons express functional receptors for acetylcholine, GABA, glutamate, octopamine, and dopamine. *J Neurophysiol 81, page(s) 1-14.*

Chiang A S, Blum A, Barditch J, Chen Y H, Chiu S L, Regulski M, Armstrong J D, Tully T et Dubnau J, 2004. radish encodes a phospholipase-A2 and defines a neural circuit involved in anesthesia-resistant memory. *Curr Biol 14, page(s) 263-272.*

Chittka L, Thomson J et Waser N, 1999. Flower constancy, insect psychology and plant evolution. *Naturwissenschaften 86, page(s) 361-377.*

Clayton N S, Bussey T J et Dickinson A, 2003. Can animals recall the past and plan for the future? *Nat Rev Neurosci 4, page(s) 685-691.*

Cohen T E, Kaplan S W, Kandel E R et Hawkins R D, 1997. A simplified preparation for relating cellular events to behavior: mechanisms contributing to habituation, dishabituation, and sensitization of the *Aplysia* gill-withdrawal reflex. *J Neurosci 17, page(s) 2886-2899.*

Colhoun E, 1963. The physiological significance of acetylcholine in insects and observations upon other pharmacological active substances. *Adv Insect Physiol 1, page(s) 1-46.*

Collett T S et Collett M, 2002. Memory use in insect visual navigation. *Nat Rev Neurosci 3, page(s) 542-552.*

Courjaret R, Grolleau F et Lapied B, 2003. Two distinct calcium-sensitive and -insensitive PKC up- and down-regulate an α -bungarotoxin-resistant nAChR1 in insect neurosecretory cells (DUM neurons). *Eur J Neurosci* 17, page(s) 2023-2034.

Courjaret R et Lapied B, 2001. Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* 60, page(s) 80-91.

- D -

David J et Sattelle D, 1990. Ionic basis of membrane potential and of acetylcholine-induced currents in the cell body of the cockroach fast coxal depressor motor neuron. *J Exp Biol* 151, page(s) 21-39.

Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M et Pham-Delègue M-H, 2004a. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pest Biochem Physiol* 78, page(s) 83-92.

Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M et Pham-Delègue M H, 2004b. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 57, page(s) 410-419.

Decourtye A, Lacassie E et Pham-Delègue M H, 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. *Pest Manag Sci* 59, page(s) 269-278.

Déglise P, Dacher M, Dion E, Gauthier M et Armengaud C, 2003. Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Neurosci* 117, page(s) 540-547.

Déglise P, Grünewald B et Gauthier M, 2002. The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci Lett* 321, page(s) 13-16.

Deisig N, Lachnit H et Giurfa M, 2002. The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learn Mem* 9, page(s) 112-121.

Deisig N, Lachnit H, Giurfa M et Hellstern F, 2001. Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination. *Learn Mem* 8, page(s) 70-78.

DeZazzo J et Tully T, 1995. Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci* 18, page(s) 212-218.

Domjan M, 2005. Pavlovian conditioning: A Functional Perspective.

Dragoi V, 1997. A Dynamic Theory of Acquisition and Extinction in Operant Learning. *Neural Netw* 10, page(s) 201-229.

Dubnau J, Chiang A S et Tully T, 2003. Neural substrates of memory: from synapse to system. *J Neurobiol* 54, page(s) 238-253.

Dubnau J, Grady L, Kitamoto T et Tully T, 2001. Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature* 411, page(s) 476-480.

Dupuy F, 2004. Apprentissage et codage olfactif chez la fourmi *Camponotus* sp. *Mémoire de DEA, Université Paul Sabatier Toulouse III.*

- E -

Ehmer B et Gronenberg W, 2002. Segregation of visual input to the mushroom bodies in the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Neurol* 451, page(s) 362-373.

Eisenhardt D, Friedrich A, Stollhoff N, Muller U, Kress H et Menzel R, 2003. The AmCREB gene is an ortholog of the mammalian CREB/CREM family of transcription factors and encodes several splice variants in the honeybee brain. *Insect Mol Biol* 12, page(s) 373-382.

Erber J, 1975a. The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*) I The time dependence of the choice reaction. *J Comp Physiol A* 99, page(s) 231-242.

-----, **1975b.** The dynamics of learning in the honeybee (*Apis mellifica carnica*) II Principles of information processing. *J Comp Physiol A* 99, page(s) 243-255.

Erber J, Kierzek S, Sander E et Grandy K, 1998. Tactile learning in the honeybee. *J Comp Physiol A* 183, page(s) 737-744.

Erber J et Kloppenburg P, 1995. The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honeybee (*Apis mellifera* L.) I. Behavioural analysis of the motion sensitive antennal reflex. *J Comp Physiol A* 176, page(s) 111-118.

Erber J, Kloppenburg P et Scheidler A, 1993a. Neuromodulation by serotonin and octopamine in the honeybee: behaviour, neuroanatomy and electrophysiology. *Experientia* 49, page(s) 1073-1083.

Erber J, Masuhr T et Menzel R, 1980. Localization of short term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol Entomol* 5, page(s) 343-358.

Erber J, Pribbenow B, Bauer A et Kloppenburg P, 1993b. Antennal reflexes in the honeybee: tools for studying the nervous system. *Apidologie* 24, page(s) 283-296.

Erber J, Pribbenow B, Grandy K et Kierzek S, 1997. Tactile motor learning in the antennal system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 181, page(s) 355-365.

Erber J, Pribbenow B, Kisch J et Faensen D, 2000. Operant conditioning of antennal muscle activity in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 186, page(s) 557-565.

Erber J et Schildberger K, 1980. Conditioning of an antennal Reflex to visual stimuli in bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 135, page(s) 217-225.

Estape N et Steckler T, 2002. Cholinergic blockade impairs performance in operant DNMTF in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72, page(s) 319-334.

- F -

Faber T, Joerges J et Menzel R, 1999. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* 2, page(s) 74-78.

Faber T et Menzel R, 2001. Visualizing mushroom body response to a conditioned odor in honeybees. *Naturwissenschaften* 88, page(s) 472-476.

Fahrbach S E, Farris S M, Sullivan J P et Robinson G E, 2003. Limits on volume changes in the mushroom bodies of the honey bee brain. *J Neurobiol* 57, page(s) 141-151.

Fahrbach S E, Moore D, Capaldi E A, Farris S M et Robinson G E, 1998. Experience-expectant plasticity in the mushroom bodies of the honeybee. *Learn Mem* 5, page(s) 115-123.

Fahrbach S E et Robinson G E, 1996. Juvenile hormone, behavioral maturation, and brain structure in the honey bee. *Dev Neurosci* 18, page(s) 102-114.

Fahrbach S E, Strande J L et Robinson G E, 1995. Neurogenesis is absent in the brains of adult honey bees and does not explain behavioral neuroplasticity. *Neurosci Lett* 197, page(s) 145-148.

Fanselow M S et Poulos A M, 2005. The Neuroscience of Mammalian Associative Learning. *Annu Rev Psychol* page(s)

Farooqui T, Robinson K, Vaessin H et Smith B H, 2003. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *J Neurosci* 23, page(s) 5370-5380.

Farris S M, 2005. Developmental organization of the mushroom bodies of *Thermobia domestica* (Zygentoma, Lepismatidae): insights into mushroom body evolution from a basal insect. *Evol Dev* 7, page(s) 150-159.

Farris S M, Abrams A I et Strausfeld N J, 2004. Development and morphology of Class II Kenyon cells in the mushroom bodies of the honey bee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 474, page(s) 325-339.

Feany M B et Quinn W G, 1995. A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Science* 268, page(s) 869-873.

Fiala A, Müller U et Menzel R, 1999. Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Neurosci* 19, page(s) 10125-10134.

Fickbohm D et Trimmer B, 2003. Antisense inhibition of neuronal nicotinic receptors in the tobacco-feeding insect, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol* 53, page(s) 172-185.

Fiorito G, Biederman G B, Davey V A et Gherardi F, 1998. The role of stimulus preexposure in problem solving by *Octopus vulgaris*. *Animal Cognition* 1, page(s) 107-112.

Flanagan D et Mercer A, 1989. Morphology and response characteristics of neurones in the deutocerebrum of the brain in the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 164, page(s) 483-494.

Fresquet N, Fournier D et 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, page(s) 349-353.

Friedrich A, Thomas U et 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, page(s) 4460-4468.

Frost L, Kaplan S W, Cohen T E, Henzi V, Kandel E R et Hawkins R D, 1997. A simplified preparation for relating cellular events to behavior: contribution of LE and unidentified siphon sensory neurons to mediation and habituation of the *Aplysia* gill- and siphon-withdrawal reflex. *J Neurosci* 17, page(s) 2900-2913.

Galizia C G, Joerges J, Kuttner A, Faber T et Menzel R, 1997. A semi-in-vivo preparation for optical recording of the insect brain. *J Neurosci Methods* 76, page(s) 61-69.

Galizia C G, McIlwrath S L et Menzel R, 1999. A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res* 295, page(s) 383-394.

Galizia C G et Menzel R, 2001. The role of glomeruli in the neural representation of odours: results from optical recording studies. *J Insect Physiol* 47, page(s) 115-130.

Gauthier M, Belzunces L, Zaoujal A, Colin M et Richard D, 1992. Modulatory effect of learning and memory on honeybee brain acetylcholinesterase activity. *Comp Biochem Physiol C* 103, page(s) 91-95.

Gauthier M, Cano Lozano V, Zaoujal A et Richard D, 1994. Effects of intracranial injections of scopolamine on olfactory conditioning retrieval in the honeybee. *Behav Brain Res* 63, page(s) 145-149.

Gauthier M, Guez D et Lambin M, 1999. Etude comparative de l'apprentissage et de la mémoire chez l'abeille et chez le vertébré. *Extrait de "Elements d'éthologie cognitive", coordonné par J Gervet et M Pratte et publié par Hermès-Science, page(s) 107-116.*

Gauthier M et Richard D, 1992. Learning-induced modifications of tonic muscle activity recorded during proboscis extension reflex in the honeybee (*Apis mellifera* L.) (Hymenoptera: Apidae). *Bee science* 2, page(s) 14-19.

Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalsky O, Wüstenberg D et Menzel R, 1996. Honeybees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52, page(s) 1079-1085.

Gerber B et Menzel R, 2000. Contextual modulation of memory consolidation. *Learn Mem* 7, page(s) 151-158.

Gerber B, Wüstenberg D, Schutz A et Menzel R, 1998. Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol Learn Mem* 69, page(s) 71-78.

Gil M et De Marco R J, 2005. Olfactory learning by means of trophallaxis in *Apis mellifera*. *J Exp Biol* 208, page(s) 671-680.

Giurfa M, 2003. Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr Opin Neurobiol* 13, page(s) 726-735.

Giurfa M et Capaldi E A, 1999. Vectors, routes and maps: new discoveries about navigation in insects. *Trends Neurosci* 22, page(s) 237-242.

Giurfa M, Eichmann B et Menzel R, 1996. Symmetry perception in an insect. *Nature* 382, page(s) 458 - 461.

Giurfa M et Malun D, 2004. Associative mechanosensory conditioning of the proboscis extension reflex in honeybees. *Learn Mem* 11, page(s) 294-302.

Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R et Srinivasan M V, 2001. The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410, page(s) 930-933.

Glanzman D L, 1995. The cellular basis of classical conditioning in *Aplysia californica*--it's less simple than you think. *Trends Neurosci* 18, page(s) 30-36.

Goldberg F, Grünewald B, Rosenboom H et Menzel R, 1999. Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honey bee *Apis mellifera*. *J Physiol London* 514 (Pt 3), page(s) 759-768.

Goodman L J, 2003. Form and function in the honeybee. *International Bee Research Association*.

Gould J L, 2004. Animal cognition. *Curr Biol* 14, page(s) R372-R375.

Granon S, Poucet B, Thinus-Blanc C, Changeux J P et Vidal C, 1995. Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology (Berl)* 119, page(s) 139-144.

Greenspan R J et van Swinderen B, 2004. Cognitive consonance: complex brain functions in the fruit fly and its relatives. *Trends Neurosci* 27, page(s) 707-711.

Greggers U et Menzel R, 1993. Memory dynamics and foraging strategies of honeybees. *Behav ecol sociobiol* 32, page(s) 17-29.

Griffiths D, Dickinson A et Clayton N, 1999. Episodic memory: what can animals remember about their past? *Trends Cogn Sci* 3, page(s) 74-80.

Gronenberg W, 2001. Subdivisions of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J Comp Neurol* 435, page(s) 474-489.

Gronenberg W et Lopez-Riquelme G O, 2005. Multisensory convergence in the mushroom bodies of ants and bees. *Acta Biol Hung* 55, page(s) 31-37.

Grunbaum L et Müller U, 1998. Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci* 18, page(s) 4384-4392.

Grünewald B, 1999. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Neurol* 404, page(s) 114-126.

Guez D, Belzunces L P et Maleszka R, 2003. Effects of imidacloprid metabolites on habituation in honeybees suggest the existence of two subtypes of nicotinic receptors differentially expressed during adult development. *Pharmacol Biochem Behav* 75, page(s) 217-222.

Guez D, Suchail S, Gauthier M, Maleszka R et Belzunces L P, 2001. Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiol Learn Mem* 76, page(s) 183-191.

Gundelfinger E et Schulz R, 2000. Insect nicotinic acetylcholine receptors: genes, structure, physiological and pharmacological properties. *Extrait de "Handbook of experimental pharmacology"*, coordonné par F Clementi, D Fornasari et C Gotti et publié par Springer-Verlag, page(s) 497-521.

- H -

Haberberger R V, Henrich M, Lips K S et Kummer W, 2003. Nicotinic receptor $\alpha 7$ -subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol* 120, page(s) 173-181.

Halm M P, Chichery M P et Chichery R, 2002. The role of cholinergic networks of the anterior basal and inferior frontal lobes in the predatory behaviour of *Sepia officinalis*. *Comp Biochem Physiol A* 132, page(s) 267-274.

Hammer M, 1993. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybee. *Nature* 366, page(s) 59-63.

-----, 1997. The learning basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20, page(s) 245-252.

Hammer M et Menzel R, 1998. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem* 5, page(s) 146-156.

Haupt S S, 2004. Antennal sucrose perception in the honey bee (*Apis mellifera* L.): behaviour and electrophysiology. *J Comp Physiol A* 190, page(s) 735-745.

Haupt S S et Klemt W, publication en cours. Habituation and dishabituation of exploratory and appetitive responses in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Behav Brain Res*, publication en cours.

Healy S D, de Kort S R et Clayton N S, 2005. The hippocampus, spatial memory and food hoarding: a puzzle revisited. *Trends in Ecology & Evolution* 20, page(s) 17.

Hedwig B et Heinrich R, 1997. Identified descending brain neurons control different stridulatory motor patterns in an acridid grasshopper. *J Comp Physiol A* 180, page(s) 285-294.

Heinrich R, Hedwig B et Elsner N, 1997. Cholinergic activation of stridulatory behaviour in the grasshopper *Omocestus viridulus* (L.). *J Exp Biol* 200, page(s) 1327-1337.

Heisenberg M, 1998. What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction. *Learn Mem* 5, page(s) 1-10.

-----, **2003.** Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4, page(s) 266-275.

Hellstern F, Malaka R et Hammer M, 1998. Backward inhibitory learning in honeybees: a behavioral analysis of reinforcement processing. *Learn Mem* 4, page(s) 429-444.

Hermitte G, Pedreira M E, Tomsic D et Maldonado H, 1999. Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 71, page(s) 34-49.

Hermesen B, Stetzer E, Thees R, Heiermann R, Schrattenholz A, Ebbinghaus U, Kretschmer A, Methfessel C, Reinhardt S et Maelicke A, 1998. Neuronal nicotinic receptors in the locust *Locusta migratoria*. Cloning and expression. *J Biol Chem* 273, page(s) 18394-18404.

Hildebrandt H et Müller U, 1995a. Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol* 27, page(s) 44-50.

-----, **1995b.** PKA activity in the antennal lobe of honeybees is regulated by chemosensory stimulation *in vivo*. *Brain Res* 679, page(s) 281-288.

Hölscher C, 1997. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 20, page(s) 298-303.

Homberg U, 1985. Interneurons of the central complex in the bee brain (*Apis mellifera*, L.). *J Insect Physiol* 31, page(s) 251-264.

Homberg U, Christensen T A et Hildebrand J G, 1989. Structure and function of the deutocerebrum in insects. *Annu Rev Entomol* 34, page(s) 477-501.

Hosler J S, Buxton K L et Smith B H, 2000. Impairment of olfactory discrimination by blockade of GABA and nitric oxide activity in the honey bee antennal lobes. *Behav Neurosci* 114, page(s) 514-525.

Huang Z-Y et Knowles C, 1990. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Comp Biochem Physiol C* 97, page(s) 275-281.

Humphries M A, Müller U, Fondrk M K et Page R E, Jr., 2003. PKA and PKC content in the honey bee central brain differs in genotypic strains with distinct foraging behavior. *J Comp Physiol A* 189, page(s) 555-562.

- I -

Isabel G, Pascual A et Prémat T, 2004. Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304, page(s) 1024-1027.

Iwama A et Shibuya T, 1998. Physiology and morphology of olfactory neurons associating with the protocerebral lobe of the honeybee brain. *J Insect Physiol* 44, page(s) 1191-1204.

- J -

Joerges J, Küttner A, Galizia G et Menzel R, 1997. Representations of odours and odours mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* 387, page(s) 285-288.

Jones A K, Grauso M et Sattelle D B, 2005. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85, page(s) 176-187.

- K -

Kamil A, 1998. On the proper definition of cognitive ecology. *Extrait de "Animal cognition in nature", coordonné par R Balda, J Pepperberg et A Kamil et publié par Academic press, page(s)*

Kamin L J, 1957. The retention of an incompletely learned avoidance response. *J Comp Physiol Psychol* 50, page(s) 457-460.

Karlin A, 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3, page(s) 102-114.

Kawai R, Sunada H, Horikoshi T et Sakakibara M, 2004. Conditioned taste aversion with sucrose and tactile stimuli in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Neurobiol Learn Mem* 82, page(s) 164-168.

Kevan P, 1987. Texture sensitivity in the life of honeybees. *Extrait de "Neurobiology and behavior of honeybees"*, coordonné par R Menzel et A Mercer et publié par Springer-Verlag, page(s) 96-101.

Kevan P et Lane M, 1985. Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, page(s) 4750-4752.

Kirchner W, 1993. Acoustical communication in honeybees. *Apidologie* 24, page(s) 297-307.

Kisch J et Erber J, 1999. Operant conditioning of antennal movements in the honey bee. *Behav Brain Res* 99, page(s) 93-102.

Kloppenburg P, 1995. Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Neurol* 363, page(s) 333-343.

Kloppenburg P et Erber J, 1995. The modulatory effects of serotonin and octopamine in the visual system of the honeybee (*Apis mellifera* L.) II. Electrophysiological analysis of motion-sensitive neurons in the lobula. *J Comp Physiol A* 176, page(s) 119-129.

Komischke B, Giurfa M, Lachnit H et Malun D, 2002. Successive olfactory reversal learning in honeybees. *Learn Mem* 9, page(s) 122-129.

Komischke B, Sandoz J C, Lachnit H et Giurfa M, 2003. Non-elemental processing in olfactory discrimination tasks needs bilateral input in honeybees. *Behav Brain Res* 145, page(s) 135-143.

Krasne F B et Glanzman D L, 1995. What We can Learn from Invertebrate Learning.

Kreissl S et Bicker G, 1989. Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol* 286, page(s) 71-84.

- L -

Laffray S, 2003. Influence des facteurs motivationnels sur les performances d'apprentissage et de mémorisation chez l'abeille *Apis mellifera*. *Mémoire de DEA, Université Paul Sabatier Toulouse III*.

Lambin M, Armengaud C, Raymond S et Gauthier M, 2001. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol* 48, page(s) 129-134.

Lambin M, Déglise P et Gauthier M, 2005. Antennal movements as indicators of odor detection by worker honeybees. *Apidologie* 36, page(s) 119-126.

Lansdell S J et Millar N S, 2000. The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39, page(s) 671-679.

Laurent G, 2002. Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci* 3, page(s) 884-895.

Le Novère N et Changeux J P, 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40, page(s) 155-172.

Le Novère N, Corringer P J et Changeux J P, 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53, page(s) 447-456.

Leboulle G et Muller U, 2004. Synergistic activation of insect cAMP-dependent protein kinase A (type II) by cyclicAMP and cyclicGMP. *FEBS Lett* 576, page(s) 216-220.

Lechner H A et Byrne J H, 1998. New perspectives on classical conditioning: a synthesis of Hebbian and non-Hebbian mechanisms. *Neuron* 20, page(s) 355-358.

Lee D et O'Dowd D K, 1999. Fast excitatory synaptic transmission mediated by nicotinic acetylcholine receptors in *Drosophila* neurons. *J Neurosci* 19, page(s) 5311-5321.

Levin E D et Simon B B, 1998. Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)* 138, page(s) 217-230.

Lukas R J, Changeux J P, Le Novère N, Albuquerque E X, Balfour D J, Berg D K, Bertrand D, Chiappinelli V A, Clarke P B, Collins A C, Dani J A, Grady S R, Kellar K J, Lindstrom J M, Marks M J, Quik M, Taylor P W et Wonnacott S, 1999. International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51, page(s) 397-401.

Lukowiak K, Sangha S, Scheibenstock A, Parvez K, McComb C, Rosenegger D, Varshney N et Sadamoto H, 2003. A molluscan model system in the search for the engram. *J Physiol Paris* 97, page(s) 69-76.

- M -

Maleszka R et Helliwell P, 2001. Effect of juvenile hormone on short-term olfactory memory in young honeybees (*Apis mellifera*). *Horm Behav* 40, page(s) 403-408.

Maleszka R, Helliwell P et Kucharski R, 2000. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behav Brain Res* 115, page(s) 49-53.

Mallon E B, Brockmann A et Schmid-Hempel P, 2003. Immune response inhibits associative learning in insects. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270, page(s) 2471-2473.

Mauelshagen J, 1993. Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* 69, page(s) 609-625.

McGuire S E, Le P T et Davis R L, 2001. The role of *Drosophila* mushroom body signaling in olfactory memory. *Science* 293, page(s) 1330-1333.

Menzel R, 1979. Behavioural access to short-term memory in bees. *Nature* 281, page(s) 368-369.

-----, **1985.** Learning in honeybees in an ecological and behavioral context. *Extrait de "Experimental behavioral ecology", coordonné par B Hölldobler et M Lindauer et publié par Fischer-Verlag, page(s) 55-74.*

-----, **1990.** Learning, memory and "cognition" in honeybees. *Extrait de "Neurobiology of comparative cognition", coordonné par R Kesner et D Olton et publié par Lawrence Erlbaum associates, Publishers, page(s) 237-292.*

-----, **1999.** Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185, page(s) 323-340.

Menzel R et Bitterman M, 1983. Learning by honeybees in an unnatural situation. *Extrait de "Neuroethology and behavioral physiology", coordonné par F Hubert et H Markl et publié par Springer-Verlag, page(s) 206-215.*

Menzel R, Brandt R, Gumbert A, Komischke B et Kunze J, 2000. Two spatial memories for honeybee navigation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267, page(s) 961-968.

Menzel R, Erber J et Masuhr T, 1974. Learning and memory in the honeybee. *Extrait de "Experimental analysis of insect behaviour", coordonné par L Browne et publié par Springer-Verlag, page(s) 195-217.*

Menzel R, Gaio U, Gerberding M, Nemrava E et Wittstock S, 1993. Formation of long term olfactory memory in honeybees does not require protein synthesis. *Naturwissenschaften* 80, page(s) 380-382.

Menzel R et Giurfa M, 2001. Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn Sci* 5, page(s) 62-71.

Menzel R, Greggers U, Smith A, Berger S, Brandt R, Brunke S, Bundrock G, Hulse S, Plumpe T, Schaupp F, Schuttler E, Stach S, Stindt J, Stollhoff N et Watzl S,

2005. Honey bees navigate according to a map-like spatial memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, page(s) 3040-3045.

Menzel R, Heyne A, Kinzel C, Gerber B et Fiala A, 1999. Pharmacological dissociation between the reinforcing, sensitizing, and response-releasing functions of reward in honeybee classical conditioning. *Behav Neurosci* 113, page(s) 744-754.

Menzel R, Manz G, Menzel R et Greggers U, 2001. Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learn Mem* 8, page(s) 198-208.

Mercer A et Menzel R, 1982. The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 145, page(s) 363-368.

Meulemans A, Mothet J P, Schirar A, Fossier P, Tauc L et Baux G, 1995. A nitric oxide synthase activity is involved in the modulation of acetylcholine release in *Aplysia* ganglion neurons: a histological, voltammetric and electrophysiological study. *Neuroscience* 69, page(s) 985-995.

Michelsen A, 2003. Signals and flexibility in the dance communication of honeybees. *J Comp Physiol A* 189, page(s) 165-174.

Milner B, Squire L R et Kandel E R, 1998. Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, page(s) 445-468.

Mizunami M, Weibrecht J M et Strausfeld N J, 1998. Mushroom bodies of the cockroach: their participation in place memory. *J Comp Neurol* 402, page(s) 520-537.

Mobbs P, 1982. The brain of the honeybee *Apis mellifera*. I The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Phil trans r soc Lond B* 298, page(s) 309-354.

-----, **1984.** Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. *J Insect Physiol* 30, page(s) 43-58.

Müller D, Abel R, Brandt R, Zockler M et Menzel R, 2002. Differential parallel processing of olfactory information in the honeybee, *Apis mellifera* L. *J Comp Physiol A* 188, page(s) 359-370.

Müller D, Gerber B, Hellstern F, Hammer M et Menzel R, 2000. Sensory preconditioning in honeybees. *J Exp Biol* 203 Pt 8, page(s) 1351-1364.

Müller U, 1994. Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Eur J Neurosci* 6, page(s) 1362-1370.

-----, **1996.** Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron* 16, page(s) 541-549.

-----, 1997. The nitric oxide system in insects. *Prog Neurobiol* 51, page(s) 363-381.

-----, 2000. Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27, page(s) 159-168.

Müller U et Bicker G, 1994. Calcium-activated release of nitric oxide and cellular distribution of nitric oxide-synthesizing neurons in the nervous system of the locust. *J Neurosci* 14, page(s) 7521-7528.

Müller U et Hildebrandt H, 1995. The nitric oxide/cGMP system in the antennal lobe of *Apis mellifera* is implicated in integrative processing of chemosensory stimuli. *Eur J Neurosci* 7, page(s) 2240-2248.

-----, 2002. Nitric oxide/cGMP-mediated protein kinase A activation in the antennal lobes plays an important role in appetitive reflex habituation in the honeybee. *J Neurosci* 22, page(s) 8739-8747.

- N -

Nauen R, Ebbinghaus-Kintscher U et Schmuck R, 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Pest Manag Sci* 57, page(s) 577-586.

- O -

Ocker W G, Hedwig B et Elsner N, 1995. Application of putative neurotransmitters elicits and modulates stridulation in two species of acridid grasshopper. *J Exp Biol* 198, page(s) 1701-1710.

Oleskevich S, 1999. Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies *in vitro*. *J Neurophysiol* 82, page(s) 1091-1096.

Oleskevich S, Clements J D et Srinivasan M V, 1997. Long-term synaptic plasticity in the honeybee. *J Neurophysiol* 78, page(s) 528-532.

Ortells M O et Lunt G G, 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18, page(s) 121-127.

Osborne R H, 1996. Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors. *Pharmacol Ther* 69, page(s) 117-142.

Page R E, Jr. et Erber J, 2002. Levels of behavioral organization and the evolution of division of labor. *Naturwissenschaften* 89, page(s) 91-106.

Page R E, Jr., Erber J et Fondrk M K, 1998. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 182, page(s) 489-500.

Pankiw T et Page R E, Jr., 1999. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 185, page(s) 207-213.

Parent M B et Baxter M G, 2004. Septohippocampal acetylcholine: involved in but not necessary for learning and memory? *Learn Mem* 11, page(s) 9-20.

Pascual A, Huang K L, Neveu J et Pr at T, 2004. Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory. *Nature* 427, page(s) 605-606.

Pascual A et Pr at T, 2001. Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294, page(s) 1115-1117.

Paterson D et Nordberg A, 2000. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol* 61, page(s) 75-111.

Pedreira M E, Dimant B, Tomsic D, Quesada-Allue L A et Maldonado H, 1995. Cycloheximide inhibits context memory and long-term habituation in the crab *Chasmagnathus*. *Pharmacol Biochem Behav* 52, page(s) 385-395.

Pelz C, Gerber B et Menzel R, 1997. Odorant intensity as a determinant for olfactory conditioning in honeybees: roles in discrimination, overshadowing and memory consolidation. *J Exp Biol* 200 (Pt 4), page(s) 837-847.

Perazzona B, Isabel G, Pr at T et Davis R L, 2004. The role of cAMP response element-binding protein in *Drosophila* long-term memory. *J Neurosci* 24, page(s) 8823-8828.

Pereyra P, Gonzalez Portino E et Maldonado H, 2000. Long-lasting and context-specific freezing preference is acquired after spaced repeated presentations of a danger stimulus in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiol Learn Mem* 74, page(s) 119-134.

Pham-Delègue M-H, 1990. Effet de l' ge sur la réponse conditionn e d'extension du proboscis chez l'abeille domestique. *C R Acad Sci III* 310, page(s) 527-532.

-----, 2001. Le gaucho est-il l'ennemi des abeilles? *La recherche* 347, page(s) 70-73.

Pribbenow B et Erber J, 1996. Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin, and octopamine: behavior and electrophysiology. *Neurobiol Learn Mem* 66, page(s) 109-120.

- R -

R Development Core Team, 2004. R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing* ; <http://www.R-project.org>.

Rankin C H, 2004. Invertebrate Learning: What Can't a Worm Learn? *Curr Biol* 14, page(s) R617-R618.

Rathouz M M, Vijayaraghavan S et Berg D K, 1996. Elevation of intracellular calcium levels in neurons by nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Neurobiol* 12, page(s) 117-131.

Ray S et Ferneyhough B, 1997a. Seasonal variation of proboscis extension reflex conditioning in the honeybee (*Apis mellifera*). *J apicult res* 36, page(s) 108-110.

-----, **1997b.** The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *Neuroreport* 8, page(s) 789-793.

-----, **1999.** Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev Psychobiol* 34, page(s) 21-27.

Rehder V, 1987. Quantification of the honeybee's proboscis reflex by electromyographic recording. *J Insect Physiol* 33, page(s) 501-507.

-----, **1989.** Sensory pathways and motoneurons of the proboscis reflex in the suboesophageal ganglion of the honey bee. *J Comp Neurol* 279, page(s) 499-513.

Rescorla R A, 1988a. Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annu Rev Neurosci* 11, page(s) 329-352.

-----, **1988b.** Pavlovian conditioning: it's not what you think it is! *Am Psychol* 43, page(s) 151-160.

Riessberger U et Crailsheim K, 1997. Short term effect of different weather conditions upon the behaviour of forager and nurse honeybees (*Apis mellifera carnica* Pollman). *Apidologie* 28, page(s) 411-426.

Roberts A C et Glanzman D L, 2003. Learning in *Aplysia*: looking at synaptic plasticity from both sides. *Trends Neurosci* 26, page(s) 662-670.

Rohrseitz K et Tautz J, 1999. Honeybee dance communication: waggle run direction coded in antennal contacts? *J Comp Physiol A* 184, page(s) 463-470.

Rose S P, 2000. God's organism? The chick as a model system for memory studies. *Learn Mem* 7, page(s) 1-17.

Rybak J et Menzel R, 1993. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the α -lobe. *J Comp Neurol* 334, page(s) 444-465.

-----, **1998.** Integrative properties of the Pe1 neuron, a unique mushroom body output neuron. *Learn Mem* 5, page(s) 133-145.

- S -

Sachse S et Galizia C G, 2002. Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J Neurophysiol* 87, page(s) 1106-1117.

-----, **2003.** The coding of odour-intensity in the honeybee antennal lobe: local computation optimizes odour representation. *Eur J Neurosci* 18, page(s) 2119-2132.

Sachse S, Rappert A et Galizia C G, 1999. The spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees: steps towards the olfactory code. *Eur J Neurosci* 11, page(s) 3970-3982.

Sakata J T, Crews D et Gonzalez-Lima F, 2005. Behavioral correlates of differences in neural metabolic capacity. *Brain Research Reviews* 48, page(s) 1.

Salgado V L et Saar R, 2004. Desensitizing and non-desensitizing subtypes of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors in cockroach neurons. *J Insect Physiol* 50, page(s) 867-879.

Sanchez-Cassou D, 2004. Caractérisation fonctionnelle de la sous-unité Apis $\alpha 3$ entrant dans la composition des récepteurs nicotiniques chez l'abeille. *Mémoire de DEA, Université Paul Sabatier Toulouse III.*

Sandoz J-C et Pham-Delègue M-H, 2004. Spontaneous Recovery After Extinction of the Conditioned Proboscis Extension Response in the Honeybee. *Learn Mem* 11, page(s) 586-597.

Sandoz J C, Galizia C G et Menzel R, 2003. Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honeybee antennal lobes. *Neuroscience* 120, page(s) 1137-1148.

Sandoz J C, Hammer M et Menzel R, 2002. Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: US input side. *Learn Mem* 9, page(s) 337-348.

Sandoz J C, Laloi D, Odoux J F et Pham-Delègue M H, 2000. Olfactory information transfer in the honeybee: compared efficiency of classical conditioning and early exposure. *Anim Behav* 59, page(s) 1025-1034.

Sandoz J C et Menzel R, 2001. Side-specificity of olfactory learning in the honeybee: generalization between odors and sides. *Learn Mem* 8, page(s) 286-294.

Sandoz J C, Roger B et Pham-Delègue M H, 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *C R Acad Sci III* 318, page(s) 749-755.

Sattelle D B, Jones A K, Sattelle B M, Matsuda K, Reenan R et Biggin P C, 2005. Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 27, page(s) 366-376.

Sawada M et Ichinose M, 1996. Nitric oxide donor sodium nitroprusside inhibits the acetylcholine-induced K⁺ current in identified *Aplysia* neurons. *J Neurosci Res* 44, page(s) 21-26.

Scheidler A, Kaulen P, Bruning G et Erber J, 1990. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I]α-bungarotoxin binding sites in the honeybee brain. *Brain Res* 534, page(s) 332-335.

Scheiner R, 2001. Sucrose responsiveness and behaviour in honey bees (*Apis mellifera* L.). *Thèse de doctorat, Technische Universität Berlin*.

-----, **2004.** Responsiveness to sucrose and habituation of the proboscis extension response in honey bees. *J Comp Physiol A* page(s)

Scheiner R, Barnert M et Erber J, 2003a. Variation in water and sucrose responsiveness during the foraging season affects proboscis extension learning in honeybees. *Apidologie* 34, page(s) 67-72.

Scheiner R, Müller U, Heimbürger S et Erber J, 2003b. Activity of protein kinase A and gustatory responsiveness in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 189, page(s) 427-434.

Scheiner R, Page R E et Erber J, 2004. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 35, page(s) 133-142.

Scheiner R, Page R E, Jr. et Erber J, 2001a. Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honey bees of two genetic strains. *Behav Brain Res* 120, page(s) 67-73.

-----, **2001b**. The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* 76, page(s) 138-150.

Scheiner R, Pluckhahn S, Oney B, Blenau W et Erber J, 2002. Behavioural pharmacology of octopamine, tyramine and dopamine in honey bees. *Behav Brain Res* 136, page(s) 545-553.

Schmuck R, 1999. No causal relationship between Gaucho seed dressing in sunflowers and the French bee syndrome. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 52, page(s) 257-299.

Schmuck R, Schoning R, Stork A et Schramel O, 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L, Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. *Pest Manag Sci* 57, page(s) 225-238.

Schröter U et Menzel R, 2003. A new ascending sensory tract to the calyces of the honeybee mushroom body, the subesophageal-calycal tract. *J Comp Neurol* 465, page(s) 168-178.

Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelin F, Birman S et Heisenberg M, 2003. Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* 23, page(s) 10495-10502.

Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A, Aouane A, Augier R, Rougon G et Cayre M, 2003. Suppression of adult neurogenesis impairs olfactory learning and memory in an adult insect. *J Neurosci* 23, page(s) 9289-9296.

Scotto-Lomassese S, Strambi C, Strambi A, Charpin P, Augier R, Aouane A et Cayre M, 2000. Influence of environmental stimulation on neurogenesis in the adult insect brain. *J Neurobiol* 45, page(s) 162-171.

Shapira M, Thompson C K, Soreq H et Robinson G E, 2001. Changes in neuronal acetylcholinesterase gene expression and division of labor in honey bee colonies. *J Mol Neurosci* 17, page(s) 1-12.

Sharples C et Wonnacott S, 2001. Neuronal nicotinic receptors. *Tocris reviews* 19, page(s) 1-12.

Shettleworth S J, 2001. Animal cognition and animal behaviour. *Animal Behaviour* 61, page(s) 277-286.

Shoop R D, Chang K T, Ellisman M H et Berg D K, 2001. Synaptically driven calcium transients via nicotinic receptors on somatic spines. *J Neurosci* 21, page(s) 771-781.

Si A, Helliwell P et Maleszka R, 2004. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 77, page(s) 191-197.

Si M L et Lee T J, 2001. Presynaptic $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors mediate nicotine-induced nitric oxidergic neurogenic vasodilation in porcine basilar arteries. *J Pharmacol Exp Ther* 298, page(s) 122-128.

Skinner, B F, 1935. Two types of conditioned reflex and a pseudo type. *Journal of General Psychology*, 12, 66-77.

Skiri H T, Strandén M, Sandoz J C, Menzel R et Mustaparta H, 2005. Associative learning of plant odorants activating the same or different receptor neurones in the moth *Heliothis virescens*. *J Exp Biol* 208, page(s) 787-796.

Smith D A, Hoffman A F, David D J, Adams C E et Gerhardt G A, 1998. Nicotine-evoked nitric oxide release in the rat hippocampal slice. *Neurosci Lett* 255, page(s) 127-130.

Snodgrass R, 1956. Anatomy of the honey bee. *Comstock*.

Squire L R et Kandel E R, 2002. La mémoire. De l'esprit aux molécules. *De Boeck*. (Version originale : *Scientific American Library*, 1999).

Stach S, Benard J et Giurfa M, 2004. Local-feature assembling in visual pattern recognition and generalization in honeybees. *Nature* 429, page(s) 758-761.

Stollhoff S, Menzel R et Eisenhardt D, 2005. Spontaneous Recovery from Extinction Depends on the Reconsolidation of the Acquisition Memory in an Appetitive Learning Paradigm in the Honeybee (*Apis mellifera*). *J Neurosci* 25, page(s) 4485– 4492.

Stopfer M, Bhagavan S, Smith B H et Laurent G, 1997. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 390, page(s) 70-74.

Stopfer M, Jayaraman V et Laurent G, 2003. Intensity versus identity coding in an olfactory system. *Neuron* 39, page(s) 991-1004.

Strausfeld N J, 2002. Organization of the honey bee mushroom body: representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *J Comp Neurol* 450, page(s) 4-33.

Strausfeld N J, Hansen L, Li Y, Gomez R S et Ito K, 1998. Evolution, discovery, and interpretations of arthropod mushroom bodies. *Learn Mem* 5, page(s) 11-37.

Su H et O'Dowd D K, 2003. Fast synaptic currents in *Drosophila* mushroom body Kenyon cells are mediated by α -bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors and picrotoxin-sensitive GABA receptors. *J Neurosci* 23, page(s) 9246-9253.

Suzuki H, 1975. Antennal movements induced by odour and central projection of the antennal neurones in the honeybee. *J Insect Physiol* 21, page(s) 831-847.

- T -

Takeda K, 1961. Classical conditioning response in the honeybee. *J Insect Physiol* 6, page(s) 168-179.

Tanimoto H, Heisenberg M et Gerber B, 2004. Event timing turns punishment to reward. *Nature* 430, page(s) 983.

Tarsitano M S et Andrew R, 1999. Scanning and route selection in the jumping spider *Portia labiata*. *Anim Behav* 58, page(s) 255-265.

Tarsitano M S et Jackson R R, 1997. Araneophagic jumping spiders discriminate between detour routes that do and do not lead to prey. *Anim Behav* 53, page(s) 256-266.

Thany S H, Crozatier M, Raymond-Delpech V, Gauthier M et Lenaers G, 2005. Apis- α 2, Apis- α 7-1 and Apis- α 7-2: three new neuronal nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the honeybee brain. *Gene* 344, page(s) 125.

Thany S H et Gauthier M, 2005. Nicotine injected into the antennal lobes induces a rapid modulation of sucrose threshold and improves short-term memory in the honeybee *Apis mellifera*. *Brain Res* 1039, page(s) 216-219.

Thany S H, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C et Gauthier M, 2003. Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor α 3 mRNA in the brain of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 12, page(s) 255-262.

Thompson R F, 2005. In Search of Memory Traces. *Annu Rev Psychol* 56, page(s) 1-23.

Thorpe C M, Jacova C et Wilkie D M, 2004. Some pitfalls in measuring memory in animals. *Neurosci Biobehav Rev* 28, page(s) 711-718.

Tofilski A, 2000. Senescence and learning in honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60, page(s) 35-39.

Tomizawa M et Casida J E, 2001. Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag Sci* 57, page(s) 914-922.

-----, **2003.** Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* 48, page(s) 339-364.

Towne W et Kirchner W, 1989. Hearing in honeybees: detection of air-particle oscillations. *Science* 244, page(s) 686-688.

Troncoso J et Maldonado H, 2002. Two related forms of memory in the crab *Chasmagnathus* are differentially affected by NMDA receptor antagonists. *Pharmacol Biochem Behav* 72, page(s) 251-265.

Tsunoyama K et Gojobori T, 1998. Evolution of nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Mol Biol Evol* 15, page(s) 518-527.

Tully T, Pr at T, Boynton S C et Del Vecchio M, 1994. Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79, page(s) 35-47.

- V -

Vergoz V, 2004. Conditionnement aversif chez l'abeille *Apis mellifera*. *Mémoire de DEA, Université Paul Sabatier Toulouse III*.

Vijayaraghavan S, Pugh P C, Zhang Z W, Rathouz M M et Berg D K, 1992. Nicotinic receptors that bind α -bungarotoxin on neurons raise intracellular free Ca^{2+} . *Neuron* 8, page(s) 353-362.

- W -

Wang J W, Wong A M, Flores J, Vosshall L B et Axel R, 2003. Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112, page(s) 271-282.

Watanabe H, Kobayashi Y, Sakura M, Matsumoto Y et Mizunami M, 2003. Classical olfactory conditioning in the cockroach *Periplaneta americana*. *Zoolog Sci* 20, page(s) 1447-1454.

Wenzel B et Hedwig B, 1999. Neurochemical control of cricket stridulation revealed by pharmacological microinjections into the brain. *J Exp Biol* 202, page(s) 2203-2216.

Whitehead A T et Larsen J R, 1976a. Electrophysiological responses of galeal contact chemoreceptors of *Apis mellifera* to selected sugars and electrolytes. *J Insect Physiol* 22, page(s) 1609-1616.

-----, **1976b.** Ultrastructure of the contact chemoreceptors of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *Int j insect morphol embryol* 5, page(s) 301-315.

Williamson R et Chrachri A, 2004. Cephalopod neural networks. *Neurosignals* 13, page(s) 87-98.

Wilson D A, Fletcher M L et Sullivan R M, 2004. Acetylcholine and olfactory perceptual learning. *Learn Mem* 11, page(s) 28-34.

Winkler J, Thal L J, Gage F H et Fisher L J, 1998. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease. *J Mol Med* 76, page(s) 555-567.

Winston M, 1987. The biology of the honey bee. *Harvard University Press*.

Winters B D, Robbins T W et Everitt B J, 2004. Selective cholinergic denervation of the cingulate cortex impairs the acquisition and performance of a conditional visual discrimination in rats. *Eur J Neurosci* 19, page(s) 490-496.

Wittstock S, Kaatz H H et Menzel R, 1993. Inhibition of brain protein synthesis by cycloheximide does not affect formation of long-term memory in honeybees after olfactory conditioning. *J Neurosci* 13, page(s) 1379-1386.

Wolf R, Wittig T, Liu L, Wustmann G, Eyding D et Heisenberg M, 1998. *Drosophila* mushroom bodies are dispensable for visual, tactile, and motor learning. *Learn Mem* 5, page(s) 166-178.

Wong-Riley M, 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171, page(s) 11-28.

-----, 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci* 12, page(s) 94-101.

Wustenberg D, Gerber B et Menzel R, 1998. Long- but not medium-term retention of olfactory memories in honeybees is impaired by actinomycin D and anisomycin. *Eur J Neurosci* 10, page(s) 2742-2745.

Wüstenberg D G et Grünewald B, 2004. Pharmacology of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor of cultured Kenyon cells of the honeybee, *Apis mellifera*. *J Comp Physiol A* 190, page(s) 807-821.

- Y -

Yasuyama K, Meinertzhagen I A et Schurmann F W, 2002. Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 445, page(s) 211-226.

Zars T, Fischer M, Schulz R et Heisenberg M, 2000. Localization of a short-term memory in *Drosophila*. *Science* 288, page(s) 672-675.

Zayas R M, Qazi S, Morton D B et Trimmer B A, 2002. Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J Neurochem* 83, page(s) 421-431.

Zhang N, Tomizawa M et Casida J E, 2004. *Drosophila* nicotinic receptors: evidence for imidacloprid insecticide and α -bungarotoxin binding to distinct sites. *Neurosci Lett* 371, page(s) 56-59.

ANNEXES

ANNEXE 1 : PUBLICATIONS

L'annexe 1 inventorie les publications de mes années de troisième cycle, y compris trois articles (le premier, le troisième et le sixième) qui n'entraient pas dans le cadre de ma thèse. D'autre part, j'ai aussi contribué à un article sur l'effet de la morphine sur le comportement alimentaire des rats (Boghossian et al. 2001, *Mech Age Dev* 122, 1825-1839), qui ne figure pas ici.

1. **Dégli P, Dacher M, Dion E, Gauthier M et Armengaud C, 2003.**
Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Neurosci* 117, page(s) 540-547.
2. **Dacher M, Lagarrigue A et Gauthier M, 2005.** Antennal tactile learning in the honeybee: effect of nicotinic antagonists on memory dynamics. *Neuroscience* 130, page(s) 37-50.
3. **El Hassani K, Dacher M, Gauthier M et Armengaud C, 2005.** Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmac Biochem Behav*, en cours de publication.
4. **Dacher M et Gauthier M.** Associative and non-associative multi-trial learning involve NO-Synthase and MLA-sensitive nicotinic receptors in the honeybee *Apis mellifera*. Soumis à *European Journal of Neuroscience*.
5. **Gauthier M, Dacher M, Thany S H, Niggebrügge C, Dégli P, Armengaud C, Kljucovic P, Monneris A et Grünwald B.** Involvement of α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). Soumis à *Journal of Neuroscience Research*.
6. **El Hassani K, Dacher M, Garry V, Gauthier M et Armengaud C.** Effects of sublethal doses of acetamiprid on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). Article en préparation.

Les trois premières publications étant déjà parues lors de l'impression du manuscrit, elles sont reproduites dans les pages qui suivent.

Regional Brain Variations of Cytochrome Oxidase Staining During Olfactory Learning in the Honeybee (*Apis mellifera*)

Patrice Déglise, Matthieu Dacher, Emmanuelle Dion, Monique Gauthier, and Catherine Armengaud
Université Paul Sabatier Toulouse III

Regional brain variations of cytochrome oxidase (CO) staining were analyzed in the honeybee (*Apis mellifera*) after olfactory conditioning of the proboscis extension reflex. Identification of brain sites where stimuli converge was done by precise image analysis performed in antennal lobes (AL) and mushroom bodies (MB). In Experiment 1, bees received 5 odorant stimulations that induced a transient decrease of CO activity in the lateral part of the AL. In Experiment 2, bees were trained with 5-trial olfactory conditioning. CO activity transiently increased in the lips of the MB calyces. There was also a delayed increase in the lateral part of the AL. An olfactory stimulus presented alone and an odor paired to a sucrose stimulation are treated by different pathways, including both AL and MB.

The identification of brain structures and neuronal pathways involved in the different memory processes is a major challenge in the neurobiology of learning and memory (Bertaina-Anglade, Tramu, & Destrade, 2000; Poremba, Jones, & Gonzalez-Lima, 1997, 1998). Associative learning in the honeybee, represented by olfactory conditioning, is a favorable tool for searching the neural substrate of learning and memory. This insect readily acquires the olfactory conditioning, and the neural system that underlies this conditioning is easily accessible. Indeed, the honeybee is a valuable model for the cognitive neurosciences (Menzel & Giurfa, 2001).

In a one-trial paradigm, bees can learn to associate an odor (conditioned stimulus [CS]) with a drop of sucrose solution applied to its antennae (unconditioned stimulus [US]). The sucrose solution makes the honeybee reflexively extend its mouthparts. This proboscis extension reflex (PER) constitutes the unconditioned response (UR). A conditioned bee will show a PER for the odor alone (conditioned response [CR]; Bitterman, Menzel, Fietz, & Schäfer, 1983). Repeated learning trials lead to a long-term memory: The bee will retain the association for life (Bitterman et al., 1983; Hammer & Menzel, 1995; Menzel, 1990, 1999).

There are two ways to study the activity of the nervous system during learning. One way is to manipulate the brain and look for the consequences on behavior (interventionist methods such as pharmacology or lesion), the other way is to scan the brain state

after (or during) behavioral training (descriptive methods such as imagery or biochemical assay).

Interventionist methods, performed in the honeybee by using conditioning with one or several trials, have revealed multiple sites for CS-US association. Local cooling (Erber, Masuhr, & Menzel, 1980), pharmacological treatments (Cano Lozano, Armengaud, & Gauthier, 2001; Hammer & Menzel, 1998), and electrophysiological stimulations (Hammer, 1993) have shown that the lateral protocerebral lobes, the antennal lobes (AL), and the mushroom bodies (MB) are the substrates of memory phases (Hammer & Menzel, 1995). In the study by Hammer (1993), an identified neuron (VUMmx1) was shown to support the US in associative olfactory learning. The VUMmx1 projections are mainly located in the AL glomeruli, in the calyces of the MB, and in the lateral protocerebrum.

Concerning the descriptive methods, some authors have tried to identify the cellular events resulting from learning. Development of fluorescent calcium imaging to track changes in odor representation by the brain was performed by Galizia, Joerges, Küttner, Faber, and Menzel (1997); Galizia and Menzel (2001); and Joerges, Küttner, Galizia, and Menzel (1997). Each single odor triggers a different pattern of activation in the AL; only a few glomeruli of approximately 156 to 166 per AL are activated. This technique revealed learning-specific activity patterns in the bee AL glomeruli after single-trial conditioning (Faber, Joerges, & Menzel, 1999; Galizia & Menzel, 2001). Until now, the other neuropils of the honeybee brain have not been investigated by calcium imaging. The 2-deoxyglucose technique has been used in insects to localize odor-induced neuronal activity in the whole brain (Distler, Bausenwein, & Boeckh, 1998; Rodrigues, 1988). A stimulation lasting 3–7 hr was necessary to reveal AL activation. Therefore, this technique does not seem suited to test the short-term effects of a learning paradigm involving brief stimulations. Numerous physiological studies in locusts (Laurent, Wehr, & Davidowitz, 1996), bees (Stopfer, Bhagavan, Smith, & Laurent, 1997), cockroaches (Lemon & Getz, 2000), and moths (Lei, Christensen, & Hildebrand, 2002) have demonstrated spatial and temporal patterns of neural activity in AL and MB in response to odors. Although these other experiments have superior temporal resolution, they have not been applied to learning mechanisms.

Patrice Déglise, Matthieu Dacher, Emmanuelle Dion, Monique Gauthier, and Catherine Armengaud, Laboratoire de Neurobiologie de l'Insecte, Université Paul Sabatier Toulouse III.

This research was supported by Region Midi-Pyrénées Grant 99002824. We thank our colleagues Valérie Raymond, Michel Lambin, Steeve Thany, and Guillaume Barbara for helpful discussion about this work; Peter Winterton for English language improvement; and Jacques Lauga for statistical advice.

Correspondence concerning this article should be addressed to Catherine Armengaud, who is now at the Centre de Recherche sur la Cognition Animale, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex, France. E-mail: carmenga@cict.fr

Metabolic mapping of discrete brain regions using cytochrome oxidase (CO) histochemistry can constitute an alternative method. CO histochemistry has been used as a mitochondrial marker for neuronal function in mammals (Wong-Riley, 1979, 1989). In rodents, the effects of classical conditioning on CO activity in the central auditory system were investigated by using quantitative histochemistry (Poremba et al. 1997, 1998). In invertebrates, assessing CO activity is also a valid method of functional histochemistry. The consequences of pharmacological treatment on CO staining have been explored in the honeybee (Armengaud, Ait-Oubah, Causse, & Gauthier, 2001; Armengaud, Causse, Ait-Oubah, Ginolhac, & Gauthier, 2000). The effects of rapid learning-related changes on CO staining were studied in cuttlefish (Agin, Chichery, & Chichery, 2001) and showed that instrumental conditioning modifies the CO pattern activity.

The aim of the present work was to identify the brain structures activated in the short term by using multitrial conditioning. CO activation was determined after presentation of odor alone and after odor paired with sucrose. Analyses were confined to AL and MB, as these neuropils are olfactory structures and potential loci for CS-US association.

Method

Worker honeybees (*Apis mellifera*) were caught at the hive entrance and kept in a Plexiglas box for 2 hr, with food available ad libitum. Then they were anesthetized with CO₂ and fixed in small tubes as described by Armengaud et al. (2000). The bees were food deprived for 3 hr to ensure their motivation for the sucrose solution.

Experiment 1: Olfactory Stimulations

Experiment 1 was performed on two honeybee groups that received five stimulations with a 1-min intertrial interval. In one group, the odor was

delivered for 3 s (CS only), and in the control group, an airpuff (air only) was presented for 3 s on both antennae. This control takes into account the mechanosensory component of the stimulation. The odor used was coffee scent (the same brand of coffee was always used), which is composed of varied substances. The odor was sent by means of a syringe filled with 1 cm³ of ground coffee. During the first trial, the bees that spontaneously responded with a PER to the odor or the air were discarded. The honeybees were killed by decapitation either immediately or 1 min after the fifth stimulation.

Experiment 2 : Olfactory Conditioning

In this experiment, honeybees were trained to associate the coffee odor with a drop of sucrose (50% wt/vol) applied to the antennae in a five-trial conditioning with an intertrial interval of 1 min (Gerber, Wüstenberg, Schütz, & Menzel, 1998). The CS and the US were presented for 3 s. In the conditioned group, sucrose delivery started 1 s before the end of the odor (forward pairing). In the nonconditioned group, the sucrose delivery stopped 3 s before odorant onset (backward pairing). Therefore, this group was considered as a control group, because in the forward paradigm, bees presented five PERs elicited by gustatory stimulation and received five olfactory stimulations. The bees that spontaneously responded by a PER to the odor or that did not show a sugar-induced PER were discarded. Bees were killed either immediately or 1 min after the end of the learning phase.

In the conditioned group, honeybees could start to show a conditioned PER from the second trial, and during the learning session, each could perform from zero to four CRs. Bees with zero, one, or two CRs were very few and were not used. Moreover, we had previously observed that bees that made fewer than three CRs during a five-trial learning have a less than 30% probability of still being conditioned when tested 1 hr later, whereas those making three or four CRs during learning have a greater than 85% probability of being conditioned. All these preliminary data confirm that bees that made three or four CRs during the five-trial learning are almost certainly conditioned (Dacher, 2001). For both experiments, the protocol is summarized in Figure 1.

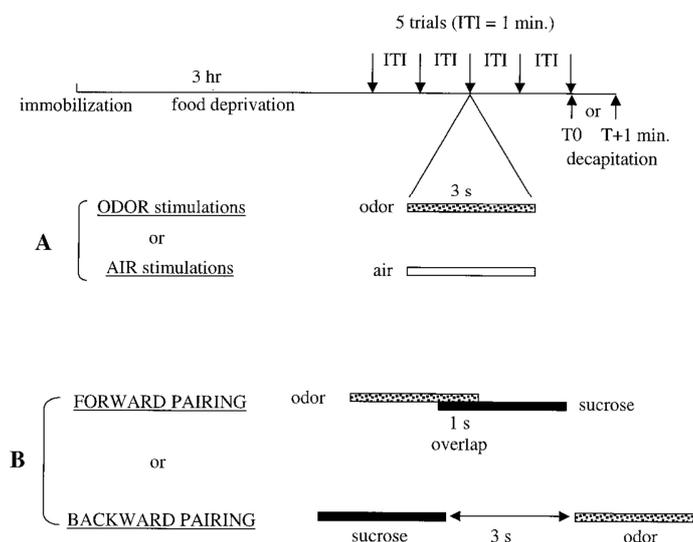


Figure 1. Experimental procedure for Experiment 1 (A) and Experiment 2 (B). A: Bees were stimulated by odor (experimental group) or air (control group) to the antennae. T0 = decapitation immediately after the last trial; T+1 = decapitation 1 min after the last trial; ITI = intertrial interval. B: Bees were stimulated by odor and sucrose at the antennae with a forward pairing (experimental group) or with a backward pairing (control group).

CO Histochemistry

After the bees were killed, their brains were dissected in ice-cold 4% (wt/vol) paraformaldehyde fixative in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) as previously described (Armengaud et al., 2000). After 1.5 hr, the fixative solution was replaced by 25% (wt/vol) sucrose buffer overnight. After a brief rinse of 5 min in 0.1 M PB, cryostat frontal sections (16 μ m) from the whole brain were incubated for CO histochemistry (30 min, 33 $^{\circ}$ C). The incubation medium consisted of 0.02% (wt/vol) cytochrome C (Sigma, St Quentin Fallavier, France), 0.06% (wt/vol) diaminobenzidine (Sigma), and 4.5% (wt/vol) sucrose in PB. The slides were dipped in cold PB, then rinsed for 5 min in PB. After dehydration in ethanol and air-drying, the slides were coverslipped.

Image and Data Analysis

A snapshot of a bee brain slice after CO staining and a schematic drawing are shown in Figure 2. Only neuropilar areas were selected to

assess CO staining. Usually, the cell bodies were not stained, in particular the Kenyon cells of the calyces. AL and MB were analyzed, as previous results indicated that these anatomical loci are involved in acquisition and retrieval processes of olfactory conditioning. In our study, the lateral protocerebral lobe was not analyzed because staining of this neuropil was heterogeneous, which made the anatomic boundaries of this structure difficult to define.

The α -lobe showed several layers, and we decided to analyze the three larger ones, which we called B1, B2, and B3. Lips and basal rings of calyces were also analyzed. The glomeruli of the AL were divided into a cortical area (ca glom) and medullar area (ma glom). Moreover, we separated each AL into a lateral side (IAL) and a medial side (mAL). This precaution was taken to avoid global analysis of the structure, which could mask a specific and local glomerulus odor-induced activation. We also analyzed the lobula of the optic lobe, as it is generally accepted that it is not involved in olfactory learning (Erber et al. 1980; Oleskevich, Clements, & Srinivasan, 1997). Analyzing the lobula allowed us to assess the potential

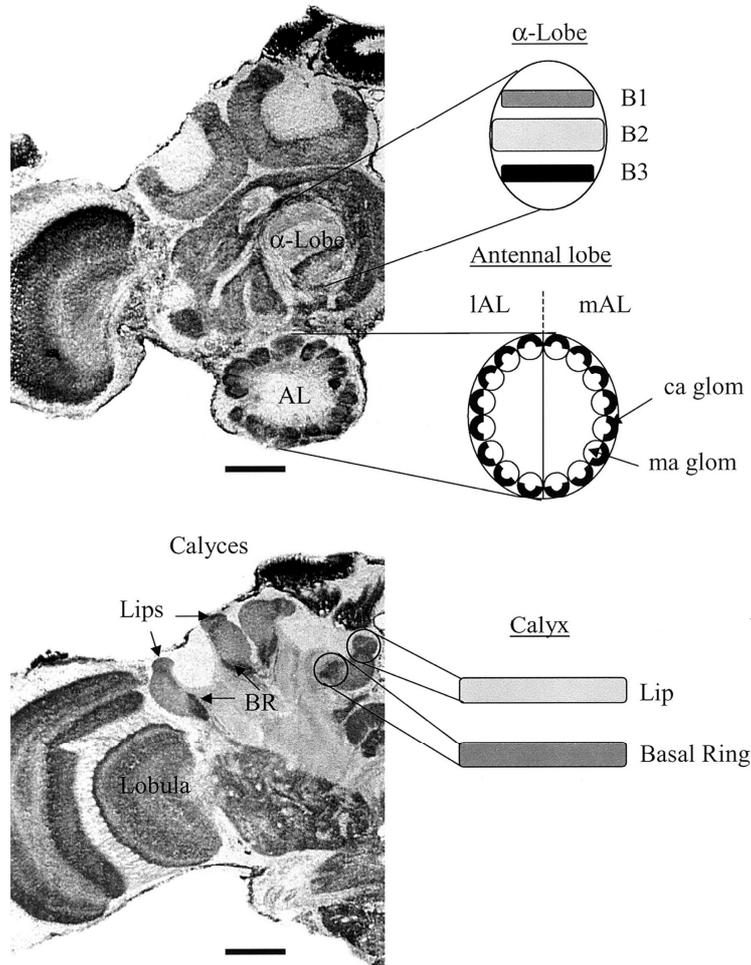


Figure 2. The honeybee brain: photomicrographs of brain slices after cytochrome oxidase staining and the corresponding schematic drawings. B1, B2, and B3 represent the three main layers analyzed in the α -lobes. IAL = lateral part of the antennal lobe; mAL = median part of the antennal lobe; ca glom = cortical area of the glomerulus; ma glom = medullar area of the glomerulus; BR = basal ring. Scale bars = 150 μ m.

interindividual variations of the global brain activity (see *Statistical Treatment*).

The size of the groups was not constant from one neuropil to another, because it sometimes happened that a structure could not be analyzed in a given brain according to standardized criteria. A slice was eliminated when it was folded or when a part of the neuropil was missing or not present through 16 μm thickness. For each neuropil, a minimum of three sections was necessary to take the brain into account.

Quantification was performed by computer-aided densitometry of CO staining intensity. The slices were observed with an AXIOPLAN Zeiss microscope (Carl Zeiss France SAS, Le Pecq, France; magnification 250 \times) connected to a computer. Optical density was determined on a gray scale (0–255) by using the image analysis software Adobe Photoshop 4.0. For each image, the gray level was corrected by the background measure from an adjacent area without tissue (background gray level minus tissue gray level). For each analyzed area, we examined three to eight consecutive sections to ensure that a comparable amount of tissue was analyzed for each brain. The values obtained for each slice were then averaged, giving a mean optical density (MOD) for each neuropil studied for each subject. This result indicated relative CO activity.

Statistical Treatment

To evaluate the relationship between staining intensity and treatment (olfactory stimulations or olfactory conditioning), we performed analysis of variance (ANOVA). As our experiments were replicated several times, we took into account a replication factor. Furthermore, as explained above, we assumed that the lobula staining could assess the potential effects of global brain activity variations. Therefore, the staining value of the lobula was used as a covariate. Analysis of covariance (ANCOVA) has also been used with CO staining by McCloskey, Adamo, and Anderson (2001) to remove global brain activity variations. However, if the addition of a covariate does not lower the residual variance, the loss of a degree of freedom lowers the power of the test. In this last case, we did not include the covariate.

All tests were two-tailed, and a probability lower than .05 was considered as significant. When the data could not be assumed to be normally distributed and of equal variance, they were transformed by taking power functions so that both hypotheses were respected. All the statistical computations were made with SPSS 9.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

The averaged MODs with standard error used in the ANOVA or ANCOVA are presented in Table 1. The results are summarized in Figure 3, corresponding to the brain activation pattern evoked by odor stimulation (Figure 3A) and by olfactory learning (Figure 3B).

Effect of Olfactory Stimulations (Experiment 1)

In this experiment, we analyzed 19–28 brains from bees killed immediately after olfactory stimulation and 11–12 brains in bees killed 1 min after stimulation.

In the group killed without delay, the ca glom of the IAL exhibited a significant decrease of CO activity in odor-stimulated bees compared with air-stimulated bees: ANCOVA, $F(1, 9) = 5.595, p = .042$. For the ma glom of the IAL, a nonsignificant decrease was observed: ANCOVA, $F(1, 9) = 4.284, p = .068$. In the mAL, a decrease was also observed in the ca glom and the ma glom, but it also was not significant: ANCOVA, $F(1, 9) = 3.706, p = .086$ and $F(1, 9) = 1.333, p = .278$, respectively. In the MB, no significant variations of the MOD were detected by ANCOVA: lips of the MB calyces, $F(1, 11) = 0.132, p = .724$; basal rings of the MB calyces, $F(1, 11) = 0.555, p = .472$; B1 layer of the MB

α -lobe, $F(1, 11) = 0.355, p = .563$; B2 layer, $F(1, 11) = 0.075, p = .790$; B3 layer, $F(1, 11) = 0.308, p = .590$.

One minute after the end of the olfactory stimulations, there was a significant decrease in the MOD of the ca glom of the mAL: ANOVA, $F(1, 8) = 6.970, p = .030$, in the odor group compared with the air group. None of the other parts of the AL: ANOVA, ca glom of IAL, $F(1, 8) = 0.708, p = .424$; ANOVA, ma glom of IAL, $F(1, 8) = 0.305, p = .596$; ANCOVA, ma glom of mAL, $F(1, 7) = 1.412, p = .273$, or the MB: ANCOVA, lips of the calyces, $F(1, 7) = 0.942, p = .364$; ANOVA, basal rings of the calyces, $F(1, 8) = 0.657, p = .441$; ANCOVA, B1 layer of the α -lobe, $F(1, 6) = 0.237, p = .644$; ANCOVA, B2 layer, $F(1, 6) = 3.048, p = .131$; ANCOVA, B3 layer, $F(1, 6) = 4.254, p = .085$, showed a significant variation.

Effects of Learning (Experiment 2)

In Experiment 2, we analyzed 33–45 brains (according to the area) from the bees killed immediately after stimulation, and 14 brains from the bees killed 1 min after stimulation.

In the lips of the MB calyces, ANOVA analysis indicated that immediately after learning, subjects of the forward pairing group presented a significantly higher MOD compared with backward pairing subjects: ANOVA, $F(1, 17) = 7.139, p = .016$. For all the other neuropils studied, there were no significant differences between the MOD of the forward pairing subjects and those of the backward pairing subjects: ANOVA, basal rings of the MB calyces, $F(1, 16) = 2.194, p = .158$; ANOVA, B1 layer of the MB α -lobe, $F(1, 18) = 0.304, p = .588$; ANCOVA, B2 layer, $F(1, 16) < 0.001, p = .984$; ANOVA, B3 layer, $F(1, 18) = 0.353, p = .560$; ANOVA, ca glom of IAL, $F(1, 8) = 1.439, p = .265$; ANOVA, ma glom of IAL, $F(1, 8) = 2.578, p = .147$; ANOVA, ca glom of mAL, $F(1, 8) = 1.048, p = .336$; ANOVA, ma glom of mAL, $F(1, 8) = 2.815, p = .132$.

One minute after the learning session, the forward pairing group presented a higher MOD compared with the backward pairing group in the ca glom of the IAL: ANOVA, $F(1, 6) = 6.986, p = .038$. There were no differences across the other areas, including no variations in MB calyces: ANCOVA, lips, $F(1, 5) = 0.141, p = .723$; ANCOVA, basal rings, $F(1, 5) = 0.831, p = .404$; ANCOVA, B1 layer of the MB α -lobe, $F(1, 5) = 0.025, p = .880$; ANCOVA, B2 layer, $F(1, 5) = 0.055, p = .824$; ANCOVA, B3 layer, $F(1, 5) = 0.703, p = .440$; ANOVA, ma glom of IAL, $F(1, 6) = 2.724, p = .150$; ANOVA, ca glom of mAL, $F(1, 6) = 3.358, p = .117$; ANOVA, ma glom of mAL, $F(1, 6) = 3.193, p = .124$.

Of the 36 comparisons in Table 1, 4 comparisons revealed significant effects ($.05 > p > .01$) for both experiments. In the case of 36 comparisons with $\alpha = .05$, the probability of having no Type 1 error is only 16%; however, the probability of having four Type 1 errors is only 7%. The bees killed after the 1-min delay were not very numerous. Therefore, the two significant p values in these two groups, which are both over .01, might be Type 1 errors.

Discussion

The use of CO histochemistry was chosen to investigate the neuronal activity of the honeybee brain. This technique allowed us to define a short-term brain map related to olfactory learning. Experiment 2 was conducted with a multitrial conditioning procedure leading to long-term memory (Menzel, 1999). We demonstrated that when an odor is rewarded with sucrose in forward

Table 1
Mean (\pm SEM) Optical Density of Cytochrome Oxidase in the Different Groups

Brain region	Immediate decapitation		Delayed decapitation	
	Air	Odor	Air	Odor
Experiment 1 (air and odor)				
MB				
Calyx				
Lip	79.5 \pm 3.2 (11)	74.3 \pm 5.6 (10)	94.4 \pm 2.8 (6)	96.7 \pm 4.9 (6)
Basal ring	94.5 \pm 4.3 (11)	92.1 \pm 5.3 (10)	109.0 \pm 2.9 (6)	110.4 \pm 4.0 (6)
α -Lobe				
B1 layer	67.7 \pm 5.2 (12)	67.1 \pm 3.6 (9)	85.3 \pm 5.9 (6)	84.5 \pm 3.7 (5)
B2 layer	51.8 \pm 4.1 (12)	48.6 \pm 3.7 (9)	65.1 \pm 2.7 (6)	70.2 \pm 5.9 (5)
B3 layer	75.3 \pm 4.5 (12)	71.5 \pm 4.3 (9)	81.7 \pm 7.1 (6)	90.6 \pm 11.3 (5)
AL				
Lateral part				
Cortical area	113.1 \pm 4.4 (10)	96.6 \pm 5.9 (9)*	118.7 \pm 2.9 (6)	118.0 \pm 3.4 (6)
Medullar area	88.5 \pm 4.1 (10)	71.4 \pm 6.3 (9)	95.2 \pm 2.6 (6)	95.8 \pm 4.6 (6)
Median part				
Cortical area	109.9 \pm 3.9 (10)	95.0 \pm 6.1 (9)	112.5 \pm 0.8 (6)	109.7 \pm 4.8 (6)*
Medullar area	86.3 \pm 4.3 (10)	72.3 \pm 6.5 (9)	90.4 \pm 2.4 (6)	87.7 \pm 5.1 (6)
Experiment 2 (learning)				
Brain region	Immediate decapitation		Delayed decapitation	
	Backward	Forward	Backward	Forward
MB				
Calyx				
Lip	49.4 \pm 3.3 (23)	57.5 \pm 4.7 (21)*	56.8 \pm 3.8 (7)	63.0 \pm 3.4 (7)
Basal ring	58.8 \pm 3.8 (23)	64.6 \pm 5.8 (20)	66.8 \pm 5.0 (7)	73.8 \pm 3.3 (7)
α -Lobe				
B1 layer	37.2 \pm 3.2 (23)	38.4 \pm 3.5 (22)	41.9 \pm 4.0 (7)	45.9 \pm 3.9 (7)
B2 layer	30.5 \pm 2.2 (23)	30.8 \pm 2.6 (22)	38.4 \pm 4.0 (7)	41.9 \pm 3.5 (7)
B3 layer	57.5 \pm 4.3 (23)	59.8 \pm 4.8 (22)	62.4 \pm 5.7 (7)	68.8 \pm 5.1 (7)
AL				
Lateral part				
Cortical area	61.6 \pm 5.5 (18)	62.6 \pm 6.1 (15)	79.9 \pm 5.0 (7)	87.5 \pm 4.7 (7)*
Medullar area	40.2 \pm 4.1 (18)	42.7 \pm 4.8 (15)	55.7 \pm 3.9 (7)	62.8 \pm 4.8 (7)
Median part				
Cortical area	61.1 \pm 5.4 (18)	62.9 \pm 5.9 (15)	78.0 \pm 4.7 (7)	83.3 \pm 4.9 (7)
Medullar area	39.7 \pm 4.1 (18)	43.7 \pm 4.9 (15)	54.1 \pm 3.8 (7)	60.2 \pm 4.9 (7)

Note. Values in parentheses are the number of bees used. MB = mushroom bodies; AL = antennal lobes. Asterisks indicate a significant difference compared with the control group (ANOVA or ANCOVA, $p < .05$).

pairing, there is an increase of neuropilar activity in the lips of the calyces, but not in the basal rings. One minute after the learning session, there was no longer a significant increase in the calyces, but there was activation of the ca glom of the IAL. When the odor was not associated with sucrose (Experiment 1), there was a transient decrease in the IAL, and a delayed decrease in the ca glom of the mAL. Hence, olfactory stimulation and olfactory learning produce two different brain maps: olfactory stimulation induced a decrease in neuropilar activity, whereas olfactory learning induced an increase in activity, especially in the lips and AL. An overview of these results is presented in Figure 3.

Our findings are interpreted as the consequences of learning on metabolism rather than the opposite (i.e., the consequence of a particular preexisting metabolism on learning), because the effects were transient. Moreover, CO staining cannot be used to study the potential effects on learning of preexisting brain variations, because this histochemical technique requires that the animal be

killed. This is why potential influences of global brain metabolism were taken into account by the ANCOVA.

Olfaction

Recent Ca^{2+} imaging studies on the AL showed that the increase of Ca^{2+} fluorescence, which is concomitant with odor presentation, is followed by a fluorescence decrease 10 s after presentation (Stetter, Greve, Galizia, & Obermayer, 2001). The time resolution of these variations is better with Ca^{2+} imaging than with CO histochemistry. CO histochemistry time resolution probably cannot reveal the earliest neural modifications. Our observations can be related to the slow decrease in Ca^{2+} imaging evoked by olfactory stimuli. CO histochemistry and Ca^{2+} imaging are linked to neuronal activity, so we can postulate that neuronal activity in AL decreased in the 10 s after odor presentation. Moreover, a strong GABAergic innervation is present in AL

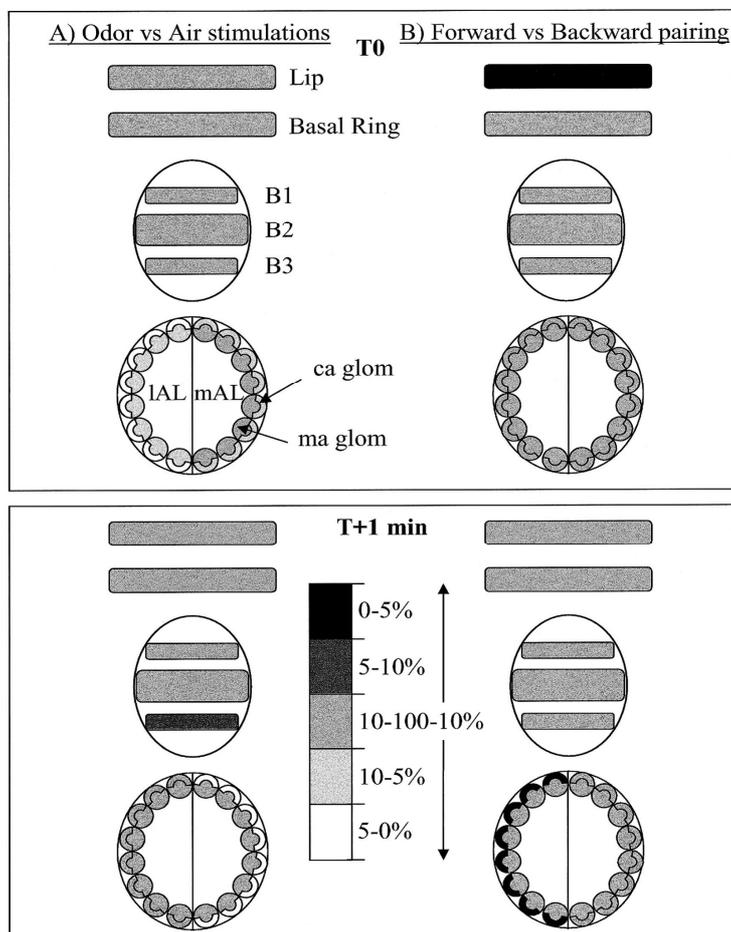


Figure 3. Comparison of schematic patterns of brain activity between odor-stimulated (A) and olfactory-conditioned (B) honeybees for T0 and T+1 min decapitation delays. The gray scale indicates the probability that the variation of cytochrome oxidase (CO) activity is different from that of controls ($0 < p < 1$). Increased CO activity is indicated by darker levels, and decreases by lighter levels. $p < .05$ (ANOVA or ANCOVA) is represented in black and white. T = delay after last trial; IAL = lateral part of the antennal lobe; mAL = median part of the antennal lobe; ca glom = cortical area of the glomerulus; ma glom = medullar area of the glomerulus.

because of the presence of GABAergic interneurons. Therefore, we can postulate that the metabolism decrease in AL is linked to the GABAergic activity described in insects during olfactory coding (Lei, Christensen, & Hildebrand, 2002; Stopfer et al., 1997).

The lips and basal rings of the calyces receive olfactory projections. The absence of effect of odor on calyx metabolism could be attributed to a preferential activation of multiglomerular output neurons, which project to the protocerebral lobes without invading the MB (Abel, Rybak, & Menzel, 2001).

Learning

Three convergence sites of the CS (odor) and the US (sucrose), namely the AL, the calyces of the MB, and the lateral protocere-

bral lobes, represent potential sites for olfactory memory. The AL are necessary during the acquisition of olfactory conditioning (Erber et al., 1980; Faber et al., 1999; Galizia & Menzel, 2001; Joerges et al., 1997). Substituting the reward in multitrial conditioning by injections of octopamine into the AL also resulted in learning. These results supported the involvement of AL in olfactory rewarded learning and octopamine as a transmitter mediating the reinforcement (Hammer & Menzel, 1998). The modifications in AL metabolism, revealed by CO histochemistry, were detected 1 min after learning, whereas in bees that were killed immediately, the increase was detected in the lips. We cannot exclude that an activation of AL occurred before lip activation. This early activation cannot be detected by CO histochemistry

because of the poor time resolution of this technique, which uses decapitation as reference time.

With Ca^{2+} imaging, Faber et al. (1999) showed that after five-trial differential conditioning, there was an increase in activity for the rewarded odor. Activity for the control odor (perception of a new odor) increased to a lesser extent than for the rewarded odor.

In the lips, significantly higher relative activity of CO was observed in the forward pairing group compared with the backward pairing group. The effect of global and local injections of cholinergic ligands in the MB have been tested on acquisition, consolidation, or retrieval of olfactory conditioning (Cano-Lozano et al. 2001; Cano-Lozano, Bonnard, Gauthier, & Richard, 1996; Cano-Lozano & Gauthier, 1998; Gauthier, Cano-Lozano, Zaoujal, & Richard, 1994). Using local injections of cholinergic antagonists, we proved that the α -lobes were necessary for the recall, but not for the acquisition, of olfactory learning (Cano-Lozano et al., 2001). On the contrary, the calyces were involved in acquisition, but not in retrieval processes, in one-trial olfactory conditioning. CO histochemistry confirmed that the calyces are activated during acquisition in five-trial conditioning. With injection techniques, it was not possible to localize the calyx region involved in acquisition with any accuracy. Therefore, we can propose that only the lips of the calyces are active during acquisition of olfactory conditioning, rather than the whole calyces.

Neither olfactory stimulations nor olfactory learning had a significant effect on α -lobe CO histochemistry. These results confirm that α -lobes are not involved in acquisition processes (Cano-Lozano et al., 2001). The absence of a role for the α -lobes during acquisition has also been found recently in *Drosophila* mutants either lacking this neuropil (Pascual & Pr eat, 2001) or having neurotransmission reversibly blocked inside the MB (Dubnau, Grady, Kitamoto, & Tully, 2001).

Cellular Aspects

From the results of the behavioral performance obtained 1 hr after the learning session, we pooled bees with three and four successive CRs in Experiment 2. We can consider that these groups attained a complete acquisition compared with bees that presented one or two CRs. However, as suggested by electrophysiological recordings in honeybees (Mauelshagen, 1993) and c-Fos protein expression in mice (Bertaina-Anglade et al., 2000), we cannot exclude the possibility that a partial acquisition (one and two CRs) could induce another metabolic pattern.

Following training, a sequence of biochemical, electrophysiological, pharmacological, and morphological events takes place. CO is an integral transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane. The last question concerns the meaning of CO modifications related to learning. Is CO histochemistry just a convenient tool to evaluate neuronal activity, or can we postulate that CO is a mitochondrial effector of plasticity? Rapid control of CO by nitric oxide (NO) has been demonstrated (Brown, 1997; Torres, Darley-Usmar, & Wilson, 1995). Nitric oxide synthase (NOS) is concentrated in the AL and lip region of the MB calyces (Müller, 1994, 1996). Blocking of NOS during associative learning impairs memory formation induced by multiple trial conditioning. Furthermore, the cytosolic Ca^{2+} threshold determines cytochrome C release from mitochondria to cytosol (Schild, Keilhoff, Augustin, Reiser, & Striggow, 2001). As in NO and Ca^{2+} studies, CO is probably more than an indicator of neuronal activity. Therefore, it

is tempting to suggest that it could reveal changes related to synaptic plasticity. A recent report indicated that mitochondrial dysfunction occurs in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's (Beal, 1998). Chronic treatment with CO inhibitor produced a spatial learning deficit in rats (Bennett, Mlady, Fleshner, & Rose, 1996). In addition to its role in neurodegenerative processes, mitochondria, through CO, could play an important role in plasticity (Williams, Thompson, Mason-Parker, & Abraham, 1998).

In conclusion, our results confirm that the AL and the lips of the calyces are sites where odor and gustative stimuli are associated. The brain networks underlying the processing of odor as sensory information and those underlying the processing of learned odor are different, more in the metabolic activity of neuropils than in the brain structures involved. The comparison of the pattern obtained after olfactory stimulation and after training indicates that odor alone elicits a decrease of metabolism in AL, whereas the reinforced odor induces an increase of metabolism in the calyces. These results suggest that different networks could be used by the same odor, depending on its significance.

References

- Abel, R., Rybak, J., & Menzel, R. (2001). Structure and response patterns of olfactory interneurons in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology*, *437*, 363–383.
- Agin, V., Chichery, R., & Chichery, M. P. (2001). Effects of learning on cytochrome oxidase activity in cuttlefish brain. *NeuroReport*, *12*, 113–116.
- Armengaud, C., Ait-Oubah, J., Causse, N., & Gauthier, M. (2001). Nicotinic acetylcholine receptor ligands differently affect cytochrome oxidase in the honeybee brain. *Neuroscience Letters*, *304*, 97–101.
- Armengaud, C., Causse, N., Ait-Oubah, J., Ginolhac, A., & Gauthier, M. (2000). Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. *Brain Research*, *859*, 390–393.
- Beal, M. F. (1998). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochemistry Biophysics Acta*, *1366*, 211–223.
- Bennet, M. C., Mlady, G. W., Fleshner M., & Rose, G. M. (1996). Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, *93*, 1330–1334.
- Bertaina-Anglade, V., Tramu, G., & Destrade, C. (2000). Differential learning-stage dependent patterns of c-fos protein expression in brain regions during the acquisition and memory consolidation of an operant task in mice. *European Journal of Neuroscience*, *12*, 3803–3812.
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., & Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology*, *97*, 107–119.
- Brown, G. C. (1997). Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: Implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *174*, 189–192.
- Cano-Lozano, V., Armengaud, C., & Gauthier M. (2001). Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *187*(A), 249–254.
- Cano-Lozano, V., Bonnard, E., Gauthier, M., & Richard, D. (1996). Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. *Behavioural Brain Research*, *81*, 215–222.
- Cano-Lozano, V., & Gauthier, M. (1998). Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *59*, 903–907.
- Dacher, M. (2001). *Retrieval in honeybee: Behavioural study and effects*

- on brain energetic activity. Unpublished DEA report, Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Distler, P. G., Bausenwein, B., & Boeckh, J. (1998). Localization of odor-induced neuronal activity in the antennal lobes of the blowfly *Calliphora vicina*: A [3H] 2-deoxyglucose labeling study. *Brain Research*, 805, 263–266.
- Dubnau, J., Grady, L., Kitamoto, T., & Tully, T. (2001, May 24). Disruption of neurotransmission in *Drosophila* mushroom body blocks retrieval but not acquisition of memory. *Nature*, 411, 476–480.
- Erber, J., Masuhr, T. H., & Menzel, R. (1980). Localisation of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, 5, 343–358.
- Faber, T., Joerges, J., & Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odours in the insect brain. *Nature Neuroscience*, 2, 74–78.
- Galizia, C. G., Joerges, J., Küttner, A., Faber, T., & Menzel, R. (1997). A semi-in-vivo preparation for optical recording in the insect brain. *Journal of Neuroscience Methods*, 76, 61–69.
- Galizia, C. G., & Menzel, R. (2001). The role of glomeruli in the neural representation of odours: Results from optical recording studies. *Journal of Insect Physiology*, 47, 115–130.
- Gauthier, M., Cano-Lozano, V., Zaoujal, A., & Richard, D. (1994). Effect of intracranial injections of scopolamine on olfactory conditioning retrieval in the honeybee. *Behavioural Brain Research*, 63, 145–149.
- Gerber, B., Wüstenberg, D., Schütz, A., & Menzel, R. (1998). Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: Non monotonous effects of the training trial interval. *Neurobiology of Learning and Memory*, 69, 71–78.
- Hammer, M. (1993, November 4). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 366, 59–63.
- Hammer, M., & Menzel, R. (1995). Learning and memory in the honeybee. *Journal of Neuroscience*, 15, 1617–1630.
- Hammer, M., & Menzel, R. (1998). Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & Memory*, 5, 146–156.
- Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G., & Menzel, R. (1997, May 15). Representation of odors and odor mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 387, 285–288.
- Laurent, G., Wehr, M., & Davidowitz, H. (1996). Temporal representations of odors in an olfactory network. *Journal of Neuroscience*, 16, 3837–3847.
- Lei, H., Christensen, T., & Hildebrand, J. (2002). Local inhibition modulates odor-evoked synchronization of glomerulus-specific output neurons. *Nature Neuroscience*, 5, 557–565.
- Lemon, W., & Getz, W. (2000). Rate code input produces temporal code output from cockroach antennal lobes. *BioSystems*, 58, 151–158.
- Mauelshagen, J. (1993). Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Journal of Neurophysiology*, 69, 609–625.
- McCloskey, D. P., Adamo, D. S., & Anderson, B. J. (2001). Exercise increases metabolic capacity in the motor cortex and striatum, but not in the hippocampus. *Brain Research*, 891, 168–175.
- Menzel, R. (1990). Learning, memory, and “cognition” in honeybees. In R. P. Kesner & D. S. Olton (Eds.), *Neurobiology of comparative cognition* (pp. 237–292). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 185(A), 323–340.
- Menzel, R., & Giurfa, M. (2001). Cognitive architecture of a mini-brain: The honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 5, 62–71.
- Müller, U. (1994). Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Neuroscience*, 6, 1362–1370.
- Müller, U. (1996). Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron*, 16, 541–549.
- Oleskevich, S., Clements, J. D., & Srinivasan, M. V. (1997). Long-term synaptic plasticity in the honeybee. *Journal of Neurophysiology*, 78, 528–532.
- Pascual, A., & Pr at, T. (2001, November 2). Localisation of long-term memory within the drosophila mushroom body. *Science*, 294, 1115–1117.
- Poremba, A., Jones, D., & Gonzalez-Lima, F. (1997). Metabolic effects of blocking tone conditioning on the rat auditory system. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68, 154–171.
- Poremba, A., Jones, D., & Gonzalez-Lima, F. (1998). Classical conditioning modifies cytochrome oxidase activity in the auditory system. *European Journal of Neuroscience*, 10, 3035–3043.
- Rodrigues, V. (1988). Spatial coding of olfactory information in the antennal lobe of *Drosophila melanogaster*. *Brain Research*, 453, 299–307.
- Schild, L., Keilhoff, G., Augustin, W., Reiser, G., & Striggow, F. (2001). Distinct Ca²⁺ thresholds determine cytochrome C release or permeability transition pore opening in brain mitochondria. *Federation of American Society for Experimental Biology Journal*, 15, 565–567.
- Stetter, M., Greve, H., Galizia, C. G., & Obermayer, K. (2001). Analysis of calcium imaging signals from the honeybee brain by nonlinear models. *NeuroImage*, 13, 119–128.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B., & Laurent, G. (1997, November 6). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, 390, 70–74.
- Torres, J., Darley-Usmar, V., & Wilson, M. T. (1995). Inhibition of cytochrome C oxidase in turnover by nitric oxide: Mechanism and implications for control of respiration. *Biochemistry Journal*, 312, 169–173.
- Williams, J. M., Thompson, V. L., Mason-Parker, S. E., Abraham, W. C., & Tate, W. P. (1998). Synaptic activity-dependent modulation of mitochondrial gene expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research*, 60, 50–56.
- Wong-Riley, M. T. T. (1979). Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Research*, 171, 11–28.
- Wong-Riley, M. T. T. (1989). Cytochrome oxidase: An endogenous metabolism marker for neuronal activity. *Trends in Neurosciences*, 12, 94–101.

Received June 19, 2002

Revision received October 1, 2002

Accepted October 24, 2002 ■

ANTENNAL TACTILE LEARNING IN THE HONEYBEE: EFFECT OF NICOTINIC ANTAGONISTS ON MEMORY DYNAMICS

M. DACHER,* A. LAGARRIGUE AND M. GAUTHIER

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

Abstract—Restrained worker honeybees (*Apis mellifera* L.) are able to learn to associate antennal-scanning of a metal plate with a sucrose reinforcement delivered to the mouthparts. Learning occurs reliably in a single association of the two sensory stimuli. The involvement of nicotinic pathways in memory formation and retrieval processes was tested by injecting, into the whole brain through the median ocellus, either mecamlamine (0.6 µg per bee) or α -bungarotoxin (2.4 ng per bee). Saline served as a control. Mecamlamine injected 10 min before the retrieval test impairs the retention level tested 3 h and 24 h after single- or multi-trial learning. Retrieval tests performed at various times after the injection show that the blocking effect of mecamlamine lasts about 1 h. The drug has no effect on the reconsolidation or extinction processes. Mecamlamine injected 10 min before conditioning impairs single-trial learning but has no effect on five-trial learning and on the consolidation process. By contrast, α -bungarotoxin only impairs the formation of long-term memory (24 h) induced by the five-trial learning and has no effect on medium-term memory (3 h), on single-trial learning or on the retrieval process. Hence, owing to previous data, at least two kinds of nicotinic receptors seem to be involved in honeybee memory, an α -bungarotoxin-sensitive and an α -bungarotoxin-insensitive receptor.

Our results extend to antennal mechanosensory conditioning the role of the cholinergic system that we had previously described for olfactory conditioning in the honeybee. Moreover, we describe here in this insect a pharmacological dissociation between α -bungarotoxin sensitive long-term memory and α -bungarotoxin insensitive medium-term memory, the last one being affected by mecamlamine. © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: antennal tactile conditioning, nicotinic receptors, α -bungarotoxin, mecamlamine, insect, invertebrate.

The honeybee is an outstanding model in neurobiology of learning and memory due to its relatively small brain with regard to its impressive behavioral repertoire (for reviews, see Menzel, 1999; Menzel and Giurfa, 2001; Page and Erber, 2002). For instance, this insect is able to learn and use conceptual rules (Giurfa et al., 2001) and can perform well in a task imposing a delayed alternation (Couvillon et al., 2003).

*Corresponding author. Tel: +33-561-557-582; fax: +33-561-556-154.

E-mail address: dacher@cict.fr (M. Dacher).

Abbreviations: ITI, inter-trial-interval; LTM, long-term memory; MTM, medium-term memory; NO, nitric oxide; PER, proboscis extension response.

0306-4522/05/\$30.00+0.00 © 2004 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2004.09.006

One of the main learning protocols used in laboratory conditions is olfactory conditioning of the proboscis extension response (PER; the proboscis is the main mouth part of the honeybee). A PER is recorded when the bee extends its proboscis beyond the virtual line between the open mandibles. During olfactory conditioning, an odour is presented to the animal, followed by an antennal sucrose stimulation that elicits the PER. Further presentations of the initial odour are sufficient to induce a PER release. The animals learn this task quickly and reliably: one paired presentation of the odour and sucrose reinforcement is sufficient to create an associative memory (Bitterman et al., 1983; Menzel and Bitterman, 1983; Sandoz et al., 1995). This conditioning has been widely studied at the anatomical (Erber et al., 1980; Faber et al., 1999; Cano Lozano et al., 2001; Déglise et al., 2003) and neuronal (Hammer, 1993, 1997; Mauelshagen, 1993; Rybak and Menzel, 1998) levels.

Multi-trial learning triggers both a medium-term memory (MTM) which underlies 3-h retrieval and a long-term memory (LTM) which underlies 24-h retrieval (MTM fades in the meantime). On the other hand, single-trial learning triggers a MTM which underlies both 3-h and 24-h retrievals (Sandoz et al., 1995; Menzel, 1999; Menzel and Giurfa, 2001). The similar performance of the animals at 24 h does not imply that the underlying memory systems are the same. Therefore, the designations "medium" and "long" for MTM and LTM reflect their order of apparition during a multi-trial learning rather than their respective duration. Different cellular events involving nitric oxide (NO; Müller, 1996), protein kinase C (Grünbaum and Müller, 1998), protein kinase A (Fiala et al., 1999) and cAMP (Müller, 2000) underlie these two forms of memory. The dissociation of different memory systems on the basis of cellular events has also been reported in other invertebrates (Burrell and Sahley, 2001), particularly for the insect in fruit fly (DeZazzo and Tully, 1995; Dubnau et al., 2003; Isabel et al., 2004).

The insect brain contains large amounts of acetylcholine (Colhoun, 1963). Moreover, nicotine binding sites (Kreissl and Bicker, 1989; Huang and Knowles, 1990; Scheidler et al., 1990) and nicotinic receptors (Bicker and Kreissl, 1994; Goldberg et al., 1999; Déglise et al., 2002; Thany et al., 2003, submitted) have been described in the honeybee brain. Oleskevich (1999) showed that cholinergic pathways are implied in the transmission of olfactory inputs. We previously showed that mecamlamine (a broad-spectrum nicotinic antagonist) inhibits both acquisition and retrieval (but not consolidation) of single-trial olfactory conditioning of the PER (Cano Lozano et al., 1996,

2001; Cano Lozano, 1997). In the same conditions α -bungarotoxin has no effects (Cano Lozano, 1997), though it is well-known to target some vertebrate nicotinic receptors and binds to those of the honeybee (Huang and Knowles, 1990; Scheidler et al., 1990; Bicker and Kreissl, 1994; Goldberg et al., 1999; Déglise et al., 2002). All these results have been obtained with single-trial learning (which leads to MTM, but not to LTM).

Olfactory conditioning of the PER is relevant to the situations honeybees encounter in their foraging life, where they have to associate flower odours with the presence of food (i.e. nectar or pollen; Menzel and Bitterman, 1983; Menzel, 1985; Gerber et al., 1996; Menzel, 1999). However, they also gather mechanosensory information with their antennae during flower exploration, hive-work and waggle dance (Kevan and Lane, 1985; Kevan, 1987; Rohrseitz and Tautz, 1999). Antennal mechanosensory plasticity can also be studied in laboratory conditions (Erber et al., 1993, 1997). In particular, antennal tactile associative learning protocols were developed and studied in detail; they involved either just a passive antennal contact (i.e. the experimenter touches the antennae), in this case learning has a purely Pavlovian base (Giurfa and Malun, 2004), or active scanning of a metal plate by the antennae (Erber et al., 1998; Kisch and Erber, 1999). In the protocol of Erber et al. (1998), blinded restrained honeybees learn to release a PER as they actively scan a small metal plate with their antennae. This learning includes both Pavlovian and operant components. Pribbenow and Erber (1996) studied the effects of biogenic amines on antennal scanning and found that octopamine enhances the frequency of antennal scanning whereas serotonin decreases it. However, the effects of biogenic amines on antennal tactile memory have not been studied yet.

Both dorsal lobes [antennal motor and mechanosensory system, (Kloppenburger, 1995)] and mushroom bodies [essential brain area for multimodal association and learning and memory (Menzel, 1999; Menzel and Giurfa, 2001)] contain acetylcholine and acetylcholine receptors (Kreissl and Bicker, 1989; Scheidler et al., 1990; Bicker and Kreissl, 1994), but the effects of nicotinic drugs on antennal tactile learning have never been studied. Therefore, we used the PER mechanosensory conditioning described by Erber et al. (1998) to assess the effect of mecamlamine and α -bungarotoxin on learning and memory. We used single-trial learning to study MTM as was done in the olfactory experiments (Cano Lozano et al., 1996) and five-trial learning to assess the effects of nicotinic antagonists (α -bungarotoxin or mecamlamine) on LTM. Furthermore, these experiments will also determine if cholinergic pathways underlie a general form of memory rather than an olfactory-specific one.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Honeybees (wild-type *Apis mellifera*) were housed in a heated hut outside the laboratory. They were captured in a small plastic box at the top of the hive and taken to the laboratory for experiments. There, they were anesthetized with a time-controlled puff of CO₂ and fixed in small plastic tubes with a wax/rosin mixture (9 g and

4 g respectively). The forelegs and the back of the head of the animal were also fixed; therefore, the animals could only move their antennae and mouthparts (including the proboscis). Once fixed, the bees' eyes were covered with water-diluted black acrylic paint. This precaution was taken to make sure that the animals did not learn visual cues such as the approach of the metal plate they are conditioned with. Then, the animals were fed with two sucrose solution drops (1.17 M) and left overnight without food to increase their motivation for the sucrose.

Conditioning procedure

During a learning trial, a metal plate (5 mm wide) with vertical engraving was presented to the antennae of the bee for 5 s. Two seconds after the onset of the plate presentation, a drop of sucrose solution (1.17 M) was directly applied to the mouthparts of the animal for five seconds. Any animal whose antennae did not scan the plate, that spontaneously showed a PER to the plate (which was uncommon) or that did not show a PER to the sucrose presentation was discarded. These precautions were taken to ensure that the honeybees effectively experienced the metal plate and were able to release a sucrose-triggered PER. Furthermore, the metal plate was cleaned in pure ethanol and dried with absorbing paper (thus making sure that there was no ethanol left) before and after each presentation. This prevented the animals from using olfactory cues. Except in experiment 9 (see below), we did not keep the few animals which spontaneously showed a PER to the plate, because it cannot be insured that these animals learn something during the conditioning session.

Retrieval tests consisted of presenting the plate for 5 s without sucrose reinforcement (see Table 1 for the number and the time course of tests performed in each experiment). A PER was recorded as a positive response. If the presentation of the plate did not elicit the PER, a drop of sucrose was presented to the animal's antennae to confirm whether it was still capable of a PER or not. This sucrose presentation was done 1 min after the plate presentation to avoid an association between the two stimuli. If the sucrose did not elicit the PER, the animal was not taken into account. If the PER was released normally during this sugar presentation, a negative response was recorded for the retrieval.

The different experimental protocols are presented in Table 1. Together, these experiments allowed us to study the different phases of antennal tactile memory.

Injection

Animals that received drugs or saline solution had to be operated on. We removed the lens covering the median ocellus and a small area of cuticle around it, making a small hole at the vertex of the animal's head. Injections made in this area rapidly reached the whole brain. The experiment was started 1 h later to allow the bees to recover from the operation. A microsyringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) was used to inject the solutions. For injection control, we used bee saline (0.2 g KCl, 9.0 g NaCl, 0.2 g CaCl₂, 4.0 g sucrose in 1 l of distilled water; colored with Methylene Blue 10⁻³ M, pH 7 adjusted with NaOH, osmolarity 320 mosmol l⁻¹; NaCl and sucrose from Sigma, St. Quentin Fallavier, France; other products from VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The volume of the injection was 0.3 μ l. In all experiments reported here, the injection was carried out at least 10 min before acquisition or retrieval (according to the experiment), as preliminary experiments showed that a saline injection carried out 5 min before a retrieval test may impair retrieval performance. Drugs (obtained from Sigma) were dissolved in saline at a concentration of 10⁻² M for mecamlamine (mecamlamine hydrochloride, this concentration leads to a dose of 0.6 μ g per bees or 6 mg kg⁻¹ assuming an approximate weight of 100 mg per honeybee) and 10⁻⁶ M for α -bungarotoxin (leading to a dose of 2.4 ng per bees or 24 μ g kg⁻¹).

Table 1. Summary of the experiments^a

Experiment	Acquisition	Retrieval test(s)	Injection	Memory phase tested
1 (Fig. 1)	Single/five trial	20 min, 3 h and 24 h	No injection, nonoperated animals	Establish the memory course
2 (Fig. 2A)	Single trial	First test and injection 20 min after acquisition, 2nd test 10, 15, 20 or 30 min after the injection, and 3rd test 1 h (only for 20 min group) or 3 h (only for 15 min group) after injection	Immediately after the first test (i.e. 20 min after the acquisition)	Duration of the drug activity on the retrieval
3 (Fig. 2B)	Single trial	First test 1 h before a second test, second test 3 h or 24 h after acquisition	10 min before the second retrieval test	Retrieval
4 (Fig. 3A)	Single trial	3 h or 24 h after acquisition	10 min before acquisition	Acquisition and consolidation
5 (Fig. 3B)	Single trial	3 h or 24 h after acquisition	Immediately after acquisition	Consolidation
6 (Fig. 4)	Five trials	First test 1 h before a second test, second test 3 h (Fig. 4A) or 24 h (Fig. 4B) after acquisition	10 min before the second retrieval test	Retrieval
7 (Fig. 5A)	Five trials	20 min, 3 h and 24 h after acquisition	10 min before acquisition	Acquisition and consolidation
8 (Fig. 5B)	Five trials	20 min, 3 h and 24 h after acquisition	Immediately after acquisition	Consolidation
9 (Fig. 6)	Five trials	20 min, 3 h and 24 h after acquisition	10 min before acquisition; some animals remain untrained	Checks the absence of unspecific effects and replicates experiment 7

^a In experiment 1, the five-trial learning protocol was performed with an inter-trial-interval (ITI) of either 1 min or 20 min. In experiments 2, 3 and 6, the pre-injection test allows to insure that the groups are identical before the injection. In experiment 2, animals tested 20 min after injection were tested again 1 h after the injection, and animals tested 15 min after the injection were tested again 3 h after the injection; this protocol investigates potential recovery from the effects of the drugs. Experiment 5 (8 for multi-trial learning) was performed to distinguish effect on acquisition and consolidation. However, as in five-trial learning the consolidation starts after the first learning trial, hence before the end of the acquisition procedure, experiment 8 cannot isolate the whole consolidation. For multi-trial learning (experiments 6, 7, 8 and 9), 1-min ITI were chosen because in experiments 7 and 9, all of the conditioning trials must remain within the activity duration of the drugs. Experiment 9 is a replication of experiment 7 during which some animals were injected and then tested without being previously conditioned. It assesses potential non-specific effects of the drugs. In this experiments, animals that spontaneously showed a PER to the plate were not discarded.

These doses are higher than those used to block learning and memory in vertebrates: for example, Estapé and Steckler (2002) used mecamlamine, 2 mg kg⁻¹ and Granon et al. (1995) used α -bungarotoxin, 1 μ g kg⁻¹. The use of such higher doses with reference to mammals is explained by the proportionally much higher quantity of nicotinic receptors in insect brains (Colhoun, 1963; Kreissl and Bicker, 1989; Scheidler et al., 1990). Furthermore, these doses have no effect on antennal movement frequency (M. Dacher, unpublished observations), nor on PER or odour perception, but are efficient to block olfactory learning and memory (Cano Lozano et al., 1996; Cano Lozano, 1997). Whole-brain global injection of higher concentrations of α -bungarotoxin or mecamlamine (respectively 10⁻⁵ M and 5 \times 10⁻² M) can affect sucrose sensitivity (M. Dacher, unpublished observations). This result can be confounded with an effect on learning and/or retrieval (Scheiner et al., 2001a,b); therefore, it was not possible to increase the concentration of our drugs in these experiments without risking such confounding factors.

Statistical treatment

The graphs show the PER rate, which is the proportion of honeybees releasing a PER during a test or a learning trial. The results were analyzed using R 1.8 (Ihaka and Gentleman, 1996; <http://www.r-project.org/>). All the tests were two-tailed, and the significance level α was set to 0.050.

Fisher's exact tests were computed to compare the PER rate between the three groups: saline-injected, mecamlamine-injected and α -bungarotoxin-injected animals (or the different learning protocol in experiment 1). R provides algorithms to compare more than two groups with Fisher's exact tests; details of the computations have been given by Mehta and Patel (1986). We

used Fisher's exact test rather than the more frequently used χ^2 test because sometimes χ^2 's validity condition was not met (i.e. calculated frequencies lower than 5). In experiment 7, we performed dual comparisons after the global test (saline vs. α -bungarotoxin and saline vs. mecamlamine, see below). As such a procedure could artificially increase the significance level α above 0.050, we corrected the yielded *P*-values with the Holm method of the R *p.adjust* function to avoid false positives.

We did not perform within-group comparisons (e.g. comparing the same animals before and after the injection), because this would assume that different times of assessment of the memory trace are directly comparable, which is not necessarily the case (Rescorla, 1988).

RESULTS

Experiment 1: learning curves

In this experiment, the memory course was compared between three conditioning protocols using non-operated animals. One protocol used a one-trial conditioning while the other two used a five-trial learning differing in the inter-trial-interval (ITI), namely ITI equals to 1 min or 20 min. The results are shown in Fig. 1.

There was no difference between performance in the two five-trial conditioning groups for each trial during acquisition (Fisher's exact test: 2nd learning trial: *P*=0.763; 3rd trial: *P*=0.296; 4th trial: *P*=0.105; 5th trial: *P*=0.213) nor between the three groups for retrieval (Fisher's exact

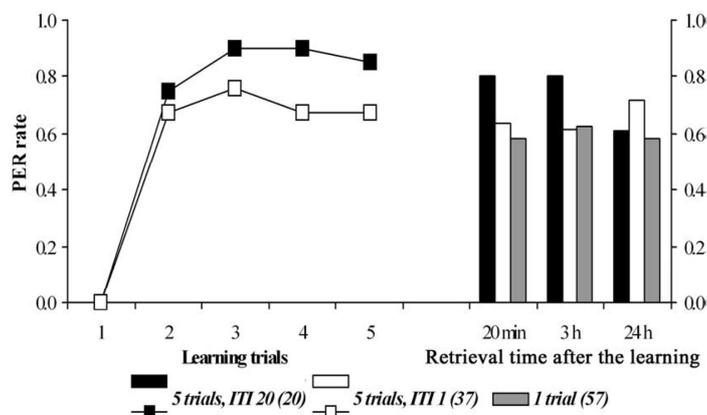


Fig. 1. Memory course experiment (experiment 1). The figure shows the PER rate during learning and retrieval tests for three groups of non-operated bees: one group with single-trial learning and two groups with five-trial learning, either with 1 min or 20 min ITI. Numbers in parenthesis are the number of bees used in each group.

test: 20 min retrieval test: $P=0.229$; 3-h retrieval test: $P=0.328$; 24-h retrieval test: $P=0.565$).

Hence, the learning protocols do not differ with regard to the acquisition level and the retrieval performance (at least until 24 h). Furthermore, as there is no decrease of the performance across the retrieval tests, three spaced retrieval tests did not lead to extinction in our experimental conditions. In subsequent experiments, the performance was sometimes lower than the performance obtained here. This can be explained by the fact that in such experiments, the animals had been operated on.

Experiment 2: drug activity duration after single-trial learning

In experiment 2 (Fig. 2A), which aimed at assessing the drug activity duration after the injection, animals conditioned with a single trial were submitted after 20 min to a first retrieval test immediately followed by the injection of the drug or saline. Then, independent groups of animals were tested again for retrieval 10 min, 15 min, 20 min or 30 min after injection. Furthermore, animals of the 20-min group were tested again 1 h after injection and animals of the 15-min group were tested again 3 h after injection. The three groups did not differ significantly during the first retrieval test before the injection (data not shown; Fisher's exact test: 10 min, $P=0.860$; 15 min, $P=0.918$; 20 min, $P=0.675$; 30 min, $P=0.695$; 1 h, $P=0.611$; 3 h, $P=0.999$). This indicates that no difference exists between the groups before the injection.

Mecamylamine-injected animals have lower performance 10 min, 15 min, 20 min and 30 min after injection compared with the α -bungarotoxin- or saline-injected animals (Fisher's exact test: 10 min, $P=0.039$; 15 min, $P=0.001$; 20 min, $P=0.019$; 30 min, $P=0.045$). One hour and 3 h after injection, the performance of mecamylamine-injected animals was no more different from the saline value and α -bungarotoxin values (Fisher's exact test: 1 h, $P=0.102$; 3 h, $P=0.928$).

Animals tested at 1 h were already tested at 20 min and animals tested at 3 h were already tested at 15 min. At the short post-injection delay (15 and 20 min), mecamylamine induced a significant decrease, but there is no more differences at the longer post-injection delay (1 h and 3 h). This recovery indicates that the amnesiac effects of mecamylamine is transient. Therefore, we conclude that the mecamylamine-induced blocking of retrieval had a peak activity for 20 min after injection, but had no further effect 1 h later. On the other hand, α -bungarotoxin had no effect on retrieval.

Experiment 3: the effect of the drugs on retrieval after single-trial learning

The previous experiment studied activity duration of the drugs on retrieval, but the injection was done long before the 1-h and 3-h retrieval tests. In experiment 3 (Fig. 2B), animals were submitted to a single-trial conditioning and tested for retrieval 2 h (or 23 h) after acquisition (test before the injection), and tested again 3 h after acquisition (or 24 h after for those tested at 23 h); this second test was preceded by an injection of saline or drug performed 10 min before. This protocol allows to assess the effects of the drugs on the retrieval at longer delay after the learning. During the first retrieval test (2 or 23 h after the acquisition), the three groups (saline, mecamylamine and α -bungarotoxin) were not different (data not shown; Fisher's exact test: 2-h test, $P=0.999$; 23-h test, $P=0.356$). This indicates that no difference exists between the groups before the injection.

The performance of the mecamylamine groups was lower than the α -bungarotoxin and the saline group at 3 h (Fisher's exact test, $P=0.049$) and at 24 h (Fisher's exact test, $P=0.004$). These results confirm that mecamylamine impairs processes needed to retrieve information stored during single-trial acquisition whereas α -bungarotoxin had no effect on them.

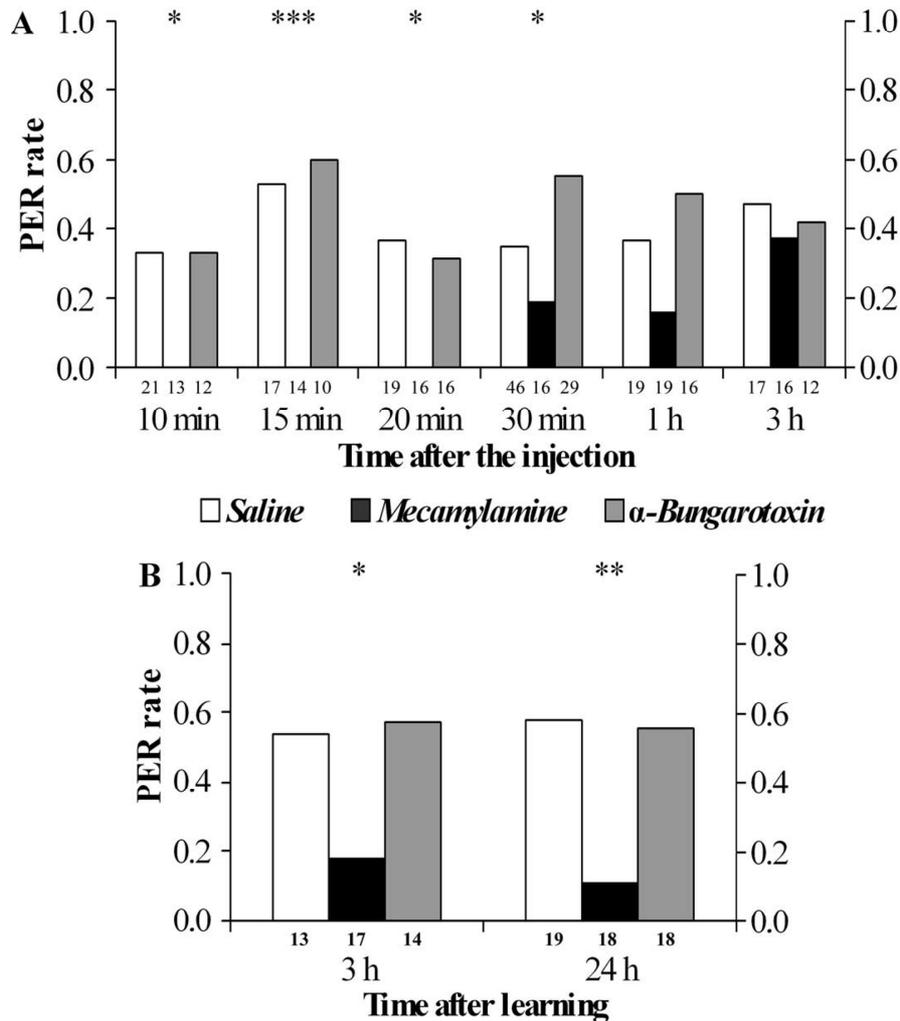


Fig. 2. Retrieval experiments after single-trial learning. (A) Duration of the drug effect on retrieval (experiment 2); (B) effect of the drugs on the retrieval (experiment 3). These graphs show the PER rate during various retrieval tests. Numbers under the x axes are the numbers of honeybees used in each group. The stars show the significant differences between the three groups. * PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P < 0.050$). ** PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P < 0.010$). *** PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P < 0.001$). (A) A first retrieval test took place 20 min after learning. Immediately after, an injection of saline, mecamylamine or α -bungarotoxin took place. Animals were tested either 10 min, 15 min, 20 min, or 30 min after the injection; 20 min groups were tested again 1 h after the injection and 15 min groups were tested again 3 h after the injection. For the 15 min and the 20 min delays, it sometimes happened that few animals in these groups did not released a PER neither during a retrieval test nor during a subsequent sugar stimulation used as a control (see Experimental Procedures section). As no response is recorded in this case, this explains why the number animals used in the 15 min/3 h and in the 20 min/1 h groups are slightly different. (B) Injection took place 10 min before the retrieval, which occurred either 3 h or 24 h after the acquisition. A first retrieval took place before the injection, either 2 h or 23 h after the acquisition.

Experiments 4 and 5: the effect of drugs on single-trial acquisition and consolidation

In experiment 4 (Fig. 3A), saline, α -bungarotoxin or mecamylamine was injected 10 min before a single-trial conditioning and could thus affect both acquisition and the subsequent consolidation process. The retrieval test was performed 3 h or 24 h after conditioning and allowed to

compare the performance between drug-injected and saline-injected groups. Animals injected with α -bungarotoxin had a retrieval performance comparable to saline-injected animals, whereas mecamylamine-injected animals showed an impaired performance (Fisher's exact test, 3-h test: $P < 0.001$; 24-h test: $P = 0.019$). As the retrieval test was performed more than 3 h after mecamylamine injection,

the drug could not have had an effect on retrieval (see experiment 2). Therefore, the observed difference can only be explained by an impairment of acquisition and/or consolidation. As α -bungarotoxin had no effect, we conclude that this drug affects neither the acquisition nor the consolidation processes and therefore this drug was not used in experiment 5, which aimed at study the drug effect on the consolidation only.

Experiment 5 (Fig. 3B) was designed to determine if mecamylamine have an effect on consolidation; it was designed in the same way as experiment 4, but the injection was done immediately after acquisition. As neither 3-h nor 24-h retrieval performance was different between mecamylamine and saline groups (Fisher's exact test, 3-h test: $P=0.515$; 24-h test= $\chi^2=721$), we conclude that consolidation was not affected by mecamylamine. Hence, the

absence of conditioned PER in experiment 4 can only be explained by an impairment of single-trial learning acquisition by mecamylamine.

Experiment 6: effect of the drugs on retrieval after five-trial learning

Experiment 6 (Fig. 4A, B) was designed in the same way as experiment 3, except that five-trial learning with a 1-min ITI was used. Its purpose was to assess the effects of nicotinic antagonists on retrieval after five-trial learning. A first retrieval test took place 2 h (Fig. 4A) or 23 h (Fig. 4B) after acquisition and served as control. The effect of the drug was tested on a retrieval test performed 1 h after this control test (i.e. 3 h or 24 h after learning); the injection took place 10 min before. There was no difference be-

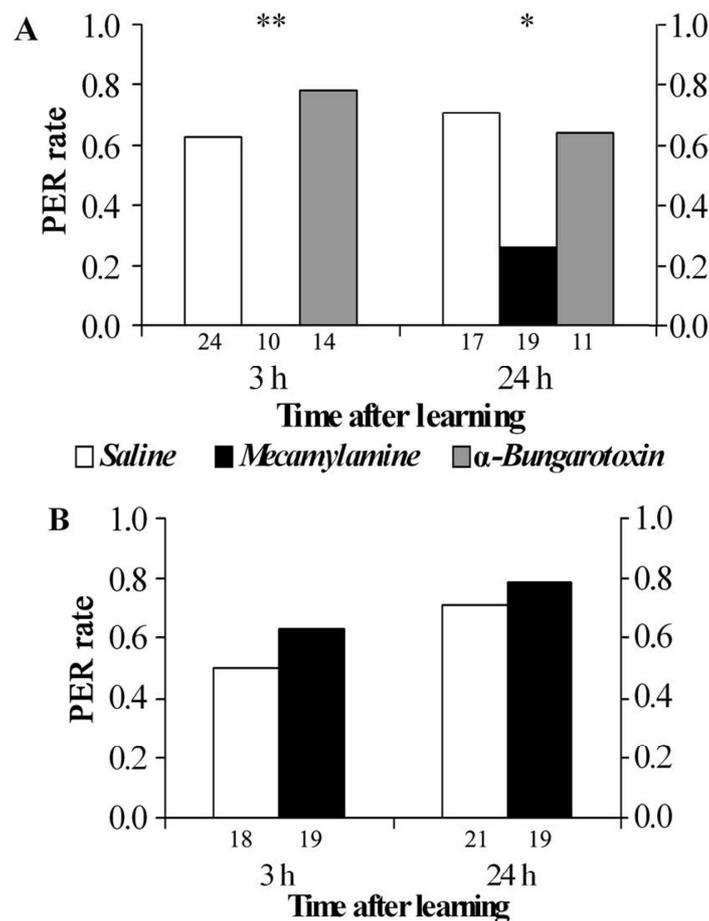


Fig. 3. Drugs' effect on acquisition and consolidation of single-trial learning. (A) Effect on single-trial acquisition (experiment 4); (B) mecamylamine effect on consolidation (experiment 5). (A) The figure shows the PER rate 3 h after a single-trial conditioning. Ten minutes before the acquisition, animals received saline, mecamylamine or α -bungarotoxin. Numbers under the x axes are the numbers of honeybees used in each group. * PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P<0.050$). ** PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P<0.010$). (B) As for A, but the injection was done immediately after the acquisition. Experiment 5 was not conducted with α -bungarotoxin because we found in experiment 4 that this drug affects neither the acquisition nor the consolidation processes.

tween the three groups neither during training nor during the test that preceded the injection (Fisher's exact test for 3-h test, Fig. 4A: 2nd learning trial: $P=0.879$; 3rd trial: $P=0.879$; 4th trial: $P=0.770$; 5th trial: $P=0.999$; 2-h test: $P=0.103$; Fisher's exact test for 24-h test, Fig. 4B: 2nd learning trial: $P=0.875$; 3rd trial: $P=0.866$; 4th trial: $P=0.625$; 5th trial: $P=0.758$; 23-h test: $P=0.839$). This indicates that no difference exists between the groups before the injection.

Mecamylamine-injected animals had a lower performance than α -bungarotoxin- and saline-injected animals (Fisher's exact test, 3-h test: $P=0.010$; 24-h test: $P=0.048$).

Therefore, we conclude that mecamylamine, but not α -bungarotoxin, impaired retrieval after a five-trial learning.

Experiment 7 and 8: effect of the drugs on five-trial acquisition and consolidation

In experiment 7, the injection was performed 10 min before a five-trial learning session (1-min ITI) and animals were tested for retrieval 20 min, 3 h and 24 h after acquisition. Such a protocol allows us to evaluate the effects of α -bungarotoxin and mecamylamine on acquisition and consolidation of five-trial learning. The results are shown in Fig. 5A. This experiment is also the model

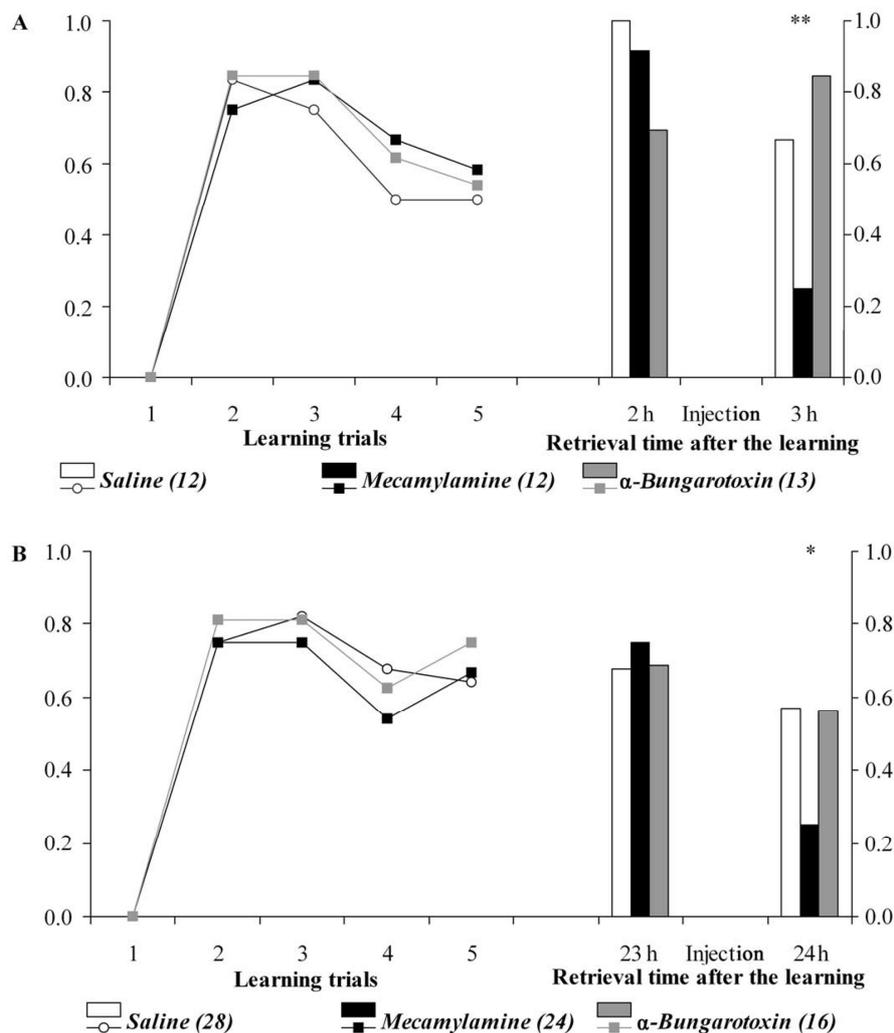


Fig. 4. Retrieval experiments after five-trial learning (experiment 6). (A) Retrieval 3 h after the acquisition (MTM); (B) retrieval 24 h after the acquisition (LTM). These graphs show the PER rate across a five trial conditioning, during a test (on the figure: 2 h or 23 h) 50 min before an injection (on the figure: Injection) that took place 10 min before a retrieval test 3 h (part A) or 24 h (part B) after acquisition. During the injection, animals received saline, mecamylamine or α -bungarotoxin. Numbers in parenthesis are the number of honeybees used in each group. * PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P<0.050$). ** PER rate difference between the groups is significant (Fisher's exact test, $P<0.010$).

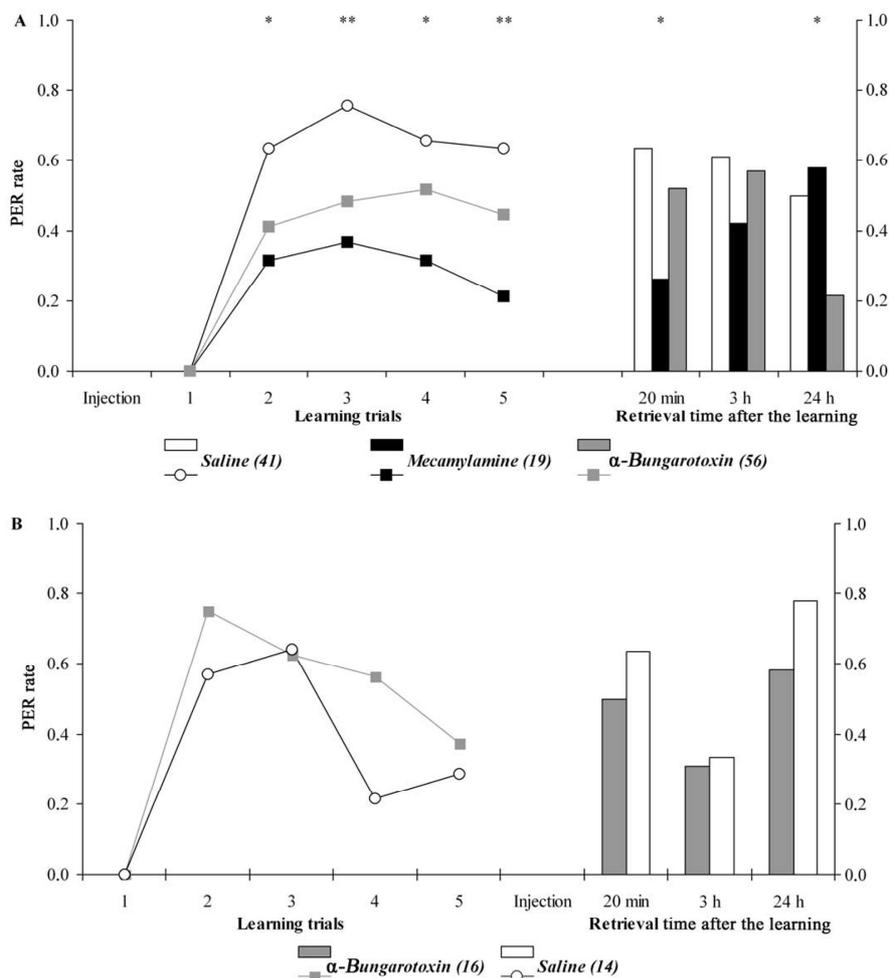


Fig. 5. Drugs' effect on acquisition and consolidation of five-trial learning. (A) The effect of the drugs on five-trial acquisition (experiment 7). (B) The effect of the drugs on five-trial consolidation (experiment 8). The figure shows the PER rate across a five-trial conditioning and for 20-min-, 3-h- and 24-h retrievals. Ten minutes before the acquisition (A) or just after the 5th trial (B), animals received mecamylamine (except in experiment 8), saline or α -bungarotoxin (on the figure: Injection). Numbers in parenthesis are the number of animal used. * Significant difference between the three groups (Fisher's exact test, $P < 0.050$). ** Significant difference between the three groups (Fisher's exact test, $P < 0.010$).

for experiment 9, which is a control experiment (see below and Fig. 6).

The learning curves of the three groups were significantly different (Fisher's exact test: 2nd learning trial, $P = 0.029$; 3rd learning trial, $P = 0.005$; 4th learning trial, $P = 0.045$; 5th learning trial, $P = 0.008$) and the 20-min retrieval performance was also different between the three groups (20 min test, $P = 0.028$). As the origin of these differences is not obvious in the Fig. 5 for the learning curve, we performed dual comparisons (saline vs. α -bungarotoxin and saline vs. mecamylamine). As explained above, to avoid the bias induced by making various comparisons using a single saline group we controlled the P -value with the Holm method. Statistical comparisons revealed that both drug-injected groups

had lower performances than the saline-injected group for the 2nd learning trial (Fisher's exact test, saline vs. mecamylamine: adjusted $P = 0.056$; Fisher's exact test, saline vs. α -bungarotoxin: adjusted $P = 0.056$) and the 3rd learning trial (Fisher's exact test, saline vs. mecamylamine: adjusted $P = 0.014$; Fisher's exact test, saline vs. α -bungarotoxin: adjusted $P = 0.014$). Mecamylamine, but not α -bungarotoxin, induced a lower performance than that of saline for the 4th learning trial (Fisher's exact test, saline vs. mecamylamine: adjusted $P = 0.049$; Fisher's exact test, saline vs. α -bungarotoxin: adjusted $P = 0.213$) and the 5th learning trial (Fisher's exact test, saline vs. mecamylamine: adjusted $P = 0.010$; Fisher's exact test, saline vs. α -bungarotoxin: adjusted $P = 0.099$).

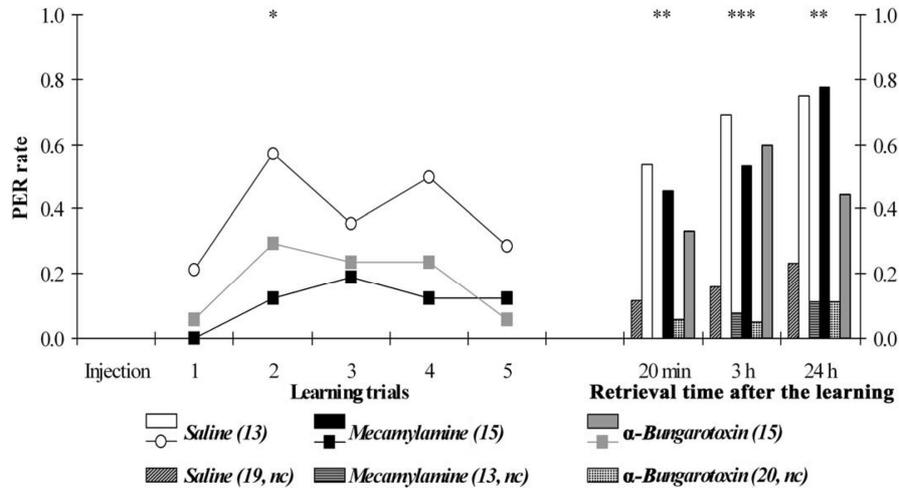


Fig. 6. Control experiment (experiment 9). This experiment is a replication of experiment 7 (Fig. 5A), but with three more groups, injected either with α -bungarotoxin, mecamylamine or saline solution; these three additional groups just received sucrose solution rather than full training. Numbers in parenthesis are the number of animal used; nc indicates that this group is not conditioned (and therefore has no learning curve). * Significant difference between the six groups (Fisher's exact test, $P < 0.050$). ** Significant difference between the three groups (Fisher's exact test, $P < 0.010$). *** Significant difference between the six groups (Fisher's exact test, $P < 0.001$).

When the animals were tested 3 h after the learning session, there were no further differences between them (Fisher's exact test: $P = 0.406$). The performance of the α -bungarotoxin-injected animals 24 h after learning was significantly lowered (Fisher's exact test: $P = 0.011$).

The significant effect for the mecamylamine group comes from the low PER rate during the acquisition and the 20-min retrieval test. Previous experiments showed that mecamylamine impairs the access to the memory trace for 1 h (see experiments 2, 3 and 6), an observation that can explain this result. As there were no further differences for the 3-h and 24-h tests, we conclude that mecamylamine decreased the learning curve (i.e. the performance during learning) but blocked neither acquisition nor consolidation during a five-trial learning; otherwise, the MTM (3-h memory) and the LTM (24-h memory) would not have been formed. On the other hand, α -bungarotoxin specifically impaired the formation of LTM. As in experiment 4, it is not possible to discriminate acquisition and consolidation in this protocol. Furthermore, one could interpret the effect of α -bungarotoxin as a 24 h-delayed effect on retrieval.

In experiment 8 (Fig. 5B), the injection was done immediately after the 5th learning trial and a retrieval test was done 20 min, 3 h and 24 h after acquisition. Thus, this experiment can only affect consolidation or, possibly, retrieval. As mecamylamine affects neither acquisition nor consolidation during five-trial learning, this drug was not used in this experiment. Saline and α -bungarotoxin did not differ during the acquisition (Fisher's exact test: 2nd learning trial, $P = 0.442$; 3rd learning trial, $P = 0.999$; 4th learning trial, $P = 0.072$; 5th learning trial, $P = 0.709$), which indicates that though saline-injected animals have a somewhat lower performance in the 4th learning trial, the groups are

similar before the injection. During the retrieval tests, the groups were identical (Fisher's exact test: 20-min retrieval test, $P = 0.689$; 3-h retrieval test, $P = 0.999$; 24-h retrieval test, $P = 0.642$). Therefore, α -bungarotoxin has no effect on the late part of consolidation. However, in multi-trial learning, consolidation starts as early as the first learning trial; as our injection was done after the fifth learning trial, it could not affect this early part of the consolidation. Thus, the α -bungarotoxin effect found in experiment 7 could be due to interference with acquisition, with the beginning of the consolidation, or with both of these processes. For this reason, we will use the term "LTM formation impairment" to refer to this effect. Furthermore, owing to the results of experiment 8, α -bungarotoxin effect in experiment 7 cannot be explained by a 24-h delayed retrieval impairment. Indeed, if it was the case, we would have observed the same impairment in this experiment.

Experiment 9: control experiment

Experiment 9 (Fig. 6) was done to further address potential non-specific effect of the drugs. It was a replication of experiment 7, but with three more groups. These additional groups were injected either with α -bungarotoxin, mecamylamine or with saline solution and did not follow the learning session but only the three retrieval tests. In other words, we used in this experiment three conditioned and three non-conditioned groups; the three non-conditioned groups only received the sucrose solution in place of the learning session. Delivering the sucrose is necessary for the validity of these controls, because different sucrose motivation levels can indirectly affect the PER rate. In this experiment, animals that spontaneously showed a PER to the plate (i.e. unconditioned PER) were not discarded, because the three non-conditioned

groups can only release unconditioned PER. This protocol allows us to check potential non-specific effects of the drugs: animals which were injected but not conditioned should have a very low PER rate, whereas those injected and trained should display the same pattern of performance than in experiment 7.

During the first learning trial, spontaneous PER were uncommon and the PER rate does not differ across the group (Fisher's exact test: 1st learning trial, $P=0.097$). During the following learning trials, saline-injected animals displayed a higher PER rate, though the difference is significant only for the second trial (Fisher's exact test: 2nd learning trial, $P=0.032$; 3rd learning trial, $P=0.643$; 4th learning trial, $P=0.073$; 5th learning trial, $P=0.221$). During the retrieval tests, the performances of the six groups (three conditioned and three unconditioned) were significantly different (Fisher's exact test: 20-min retrieval test, $P=0.006$; 3-h retrieval test, $P<0.001$; 24-h retrieval test, $P=0.003$). This significant difference can easily be explained by the performances of the non-conditioned groups, which were close to zero. Therefore, the performances of the animals in previous experiments cannot be linked to unspecific effect of the drugs, but rather depend on the fact of being conditioned or not. Furthermore, as can be seen when comparing Fig. 5A and Fig. 6, in conditioned animals the drugs had the same effect than in experiment 7.

DISCUSSION

The main finding of these experiments is that mecamlamine blocks retrieval of the tactile memory acquired in single-trial or five-trial antennal tactile conditioning procedures. The mecamlamine effect lasts for about 1 h and is acute for 20 min after the injection. This drug also blocks one-trial but not five-trial acquisition and leaves the consolidation process intact. Injection of α -bungarotoxin appeared to only block the LTM formation following five-trial learning. As discussed below, none of the drugs affect the reconsolidation or the extinction processes in our experimental conditions.

Remark on proboscis conditioning

In the present experiments, animals were conditioned using direct sucrose stimulation of the proboscis. We observed that this stimulation is less efficient than antennal sucrose stimulation to elicit a PER; some bees initially prepared for the experiment were discarded for this reason. Therefore, honeybees that released a PER after proboscis stimulation were the most motivated for sucrose and probably were the most sensitive to sucrose. This probably reduced the inter-individual variability of sucrose sensitivity, which is known to affect learning performance (Scheiner et al., 2001a,b). This explains why we obtained higher conditioning rates (Fig. 1) than with the training protocol which involves antennal sucrose stimulation (Erber et al., 1998).

Presenting sucrose to the proboscis without stimulating the antennae does not affect the antennal scanning frequency as antennal stimulation does (Pribbenow and

Erber, 1996). Therefore, this procedure allows us to clearly separate the information given to the bees: the two modalities (gustatory and mechanosensory) were gathered through different systems. This could be an advantage for further studies on neuronal networks supporting antennal tactile learning.

Specificity of the drugs' effects

Experiment 9 was designed to assess potential unspecific effects of our drug. In this experiment, in contrast to what was done in other ones, we kept the animals which spontaneously released a PER when they were presented the metal plate. However animals which received the drug without being conditioned rarely released a PER during the retrieval tests, whereas animals which followed the training session behaved like those of experiment 7. This demonstrates that at the concentration we used, the drugs do not have any unspecific behavioral effects, an unsurprising finding knowing that, as stated above, they neither affect sucrose, mechanosensory or olfactory perception, nor have motor effects. Thus, while the molecular properties of honeybee nicotinic receptors are partly unknown (but see Thany et al., 2003), these observations strongly confirm the relevance of the concentration employed in our study.

On the other hand, it could be assumed that the effects we report here are induced by a non-specific binding of the drugs. This hypothesis can be discarded, since the use of various nicotinic antagonists yielded similar results with olfactory learning. Hexamethonium triggers effects similar to those of mecamlamine (Cano Lozano, 1997) and methyllicaconitin yields results similar to those of α -bungarotoxin (our group, unpublished observations).

One can argue that mechanosensory pathways are cholinergic and that mecamlamine prevents the processing of mechanosensory input. Such an argument cannot be done with α -bungarotoxin, which is not different from control groups in most experiments. Following this hypothesis, when honeybees are submitted to a conditioning procedure or to a retrieval test, they cannot perceive the mechanosensory stimulation and cannot learn the association or respond to the conditioned stimulus. Such an explanation can be ruled out owing to the fact that mechanosensory learning is still effective under mecamlamine treatment with the five-trial learning protocol. As shown in experiments 7 and 9, honeybees learned the association, as they are able to retrieve information 24 h after learning at a level comparable with saline-injected animals. Hence, we can exclude an effect of mecamlamine on mechanosensory perception.

Injection of α -bungarotoxin had no effect in most of our experiments. So we could suspect that either the drug was degraded in the hemolymph before reaching its target or that, due to its high molecular weight (8000 Da vs. 204 Da for mecamlamine) the drug did not have enough time to diffuse toward the nicotinic receptors. The first possibility is ruled out by an experiment performed in our laboratory: α -bungarotoxin diluted either in saline alone or in honeybee brain hemolymph plus saline paralyzed the neuromuscular junction in the frog leg in both cases. This indicates

that α -bungarotoxin was not inactivated during transit in the hemolymph (P. Déglise and G. Barbara, unpublished observations). In experiments 7 and 9, α -bungarotoxin had a short term effect on LTM formation (see below), which indicates that an injection with a delay as short as 10 min before learning is sufficient. Hence, α -bungarotoxin seems to diffuse rapidly in the honeybee brain *in vivo* despite its high molecular weight and to be efficient at the concentration used.

Reconsolidation and extinction

The work of Nader et al. (2000) has awakened interest upon the reconsolidation process, showing that retrieval makes the memory trace once again unstable and sensitive to amnesic treatment, as during consolidation (Sara, 2000). In arthropods, such a process has also been described in the crab *Chasmagnathus* (Pedreira et al., 2002; Pedreira and Maldonado, 2003). The reconsolidation process is currently being studied in honeybees (Stollhoff et al., 2003), but its pharmacological and cellular bases remain to be described in this insect.

In experiment 2, as the injection was made just after a retrieval test (i.e. the pre-injection test), the mecamlamine-induced impairment observed thereafter could be explained either by an inhibition of retrieval or by an impairment of reconsolidation. However, as the retrieval impairment was transient (no further effect of mecamlamine at 1 h or 3 h), we can exclude a blocking of reconsolidation. Indeed, such a blocking would have inhibited all the subsequent retrieval tests whatever the delay, which was not the case. We therefore conclude that mecamlamine does not affect reconsolidation. On the other hand, the results indicate that α -bungarotoxin does not affect retrieval or reconsolidation.

Extinction is the decrease of animal's performance during unrewarded repeated retrieval tests. Experiment 1 showed that three spaced retrieval tests (20 min, 3 h and 24 h) do not yield extinction. Our drugs do not trigger extinction in experiment 2, which involved various retrieval tests. However, Erber et al. (1998) reported that repeated retrieval just after antennal tactile learning induced extinction; future experiments could investigate the effect of nicotinic antagonists on this process.

Honeybee memory

The results obtained with single-trial tactile learning are in total accordance with the results previously observed with single-trial olfactory learning (Cano Lozano et al., 1996; Cano Lozano, 1997) and confirm that, besides muscarinic receptors (Gauthier et al., 1994; Cano Lozano, 1997; Cano Lozano and Gauthier, 1998; Cano Lozano et al., 2001), nicotinic receptors are also involved in honeybee memory formation and retrieval. Furthermore, the effect of nicotinic antagonists on the honeybee memory is not specific for a given sensory modality (e.g. olfaction or antennal tactile perception).

The mushroom bodies in the honeybee brain receive multisensory inputs (Gronenberg, 2001). Localized cholinergic antagonist injections demonstrated that calyces and α -lobes of mushroom bodies are respectively involved in

acquisition and retrieval of one-trial olfactory learning (Cano Lozano et al., 2001). The mushroom bodies could also be involved in tactile learning and therefore in associative memory in general, as they have nicotinic receptors (Kreissl and Bicker, 1989; Scheidler et al., 1990; Bicker and Kreissl, 1994; Goldberg et al., 1999; Déglise et al., 2002; Thany et al., 2003; Thany et al., submitted).

In experiments 7 and 9, α -bungarotoxin-injected animals have a lower performance than the saline- and the mecamlamine-injected groups in the 24-h retrieval tests. The high retrieval performance of the α -bungarotoxin group 20 min and 3 h after learning led us to conclude that this drug does not block acquisition (otherwise, performance would have been impaired in all three retrieval tests). Furthermore, experiment 8 shows that retrieval tests performed 24 h after α -bungarotoxin injection were not impaired: this excludes a delayed effect of this drug on retrieval. Thus, animals formed MTM but not LTM, and as the MTM faded anyway, the 24-h performance was lower than in the control group. In this experiment, α -bungarotoxin affected acquisition and/or the earliest part of consolidation (experiment 8 excludes an effect of the latest part). Thus, we conclude that α -bungarotoxin specifically blocks LTM formation during multi-trial learning. In other invertebrates, similar dissociations between MTM and LTM were found for instance in fruit fly (Isabel et al., 2004) and cuttlefish (Bellanger et al., 2003).

Role of nicotinic receptors in honeybee memory

In the present work, mecamlamine blocked processes needed to retrieve memory from MTM and LTM, whereas α -bungarotoxin had no effect on these processes. Furthermore, LTM formation was not sensitive to mecamlamine, whereas α -bungarotoxin blocked it while sparing the MTM formation. To explain this pharmacological dissociation, we advance the idea that retrieval processes imply α -bungarotoxin-insensitive nicotinic receptors and that LTM formation is dependent on α -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors.

The existence of two nicotinic receptors subtypes, one α -bungarotoxin-sensitive and the other α -bungarotoxin-insensitive (according to neuropharmacological studies), is already well documented in insects (Buckingham et al., 1997; Lansdell and Millar, 2000; Courjaret and Lapied, 2001; Tomizawa and Casida, 2001). However, our study is the first to postulate a function of these receptors in learning and memory. We propose that the α -bungarotoxin-insensitive receptors are necessary for single-trial acquisition and for retrieval, whereas the α -bungarotoxin-sensitive receptors are necessary for LTM formation.

To go deeper into this aspect, our group has cloned genes coding for different α subunits of the nicotinic receptor and studied the localization in the honeybee brain of the corresponding mRNA (for the $\alpha 3$ subunit, see Thany et al., 2003; for other α subunits, Thany et al., submitted). Indeed, the differences between the nicotinic receptor properties might come from their subunit composition. According to this composition, nicotinic antagonists such as α -bungarotoxin and mecamlamine may or may not block nicotinic receptors. In vertebrates, pharmacology tells us that α -bungarotoxin is

the most selective antagonist of α -bungarotoxin sensitive receptors, whereas mecamylamine is a non-competitive antagonist of all nicotinic receptor (Sharples and Wonnacott, 2001). Although mecamylamine acts by blocking the opened channel of the receptor, our results suggest that it has a greater affinity to α -bungarotoxin insensitive receptors of the honeybee. A detailed knowledge of the composition and pharmacology of the honeybee nicotinic receptor is necessary to fully understand the effects of the two drugs on behavior.

Linking nicotinic receptors with the cellular substrates of honeybee memory

The two memory forms of the honeybee (MTM and LTM) have different cellular supports (Menzel, 1999; Menzel and Giurfa, 2001); in particular, NO synthesis is involved in LTM, but not in MTM. Blocking NO synthase before a multi-trial acquisition leads to impaired LTM (Müller, 1996), just like an α -bungarotoxin injection. However, the cellular events underlying the honeybee memory, including NO formation, have never been linked to cholinergic neurotransmission despite its importance during learning and memory processes. Taking into account that NO synthesis inhibition and α -bungarotoxin injections have the same effects, it is therefore possible that the stimulation of the α -bungarotoxin-sensitive receptors can trigger NO synthesis and by this way LTM formation.

NO synthase staining (Müller, 1994), α -bungarotoxin binding sites (Scheidler et al., 1990) and acetylcholinesterase staining (Kreissl and Bicker, 1989) co-localize in the mushroom bodies, which is a center for honeybee learning and memory (Erber et al., 1980; Cano Lozano et al., 2001; Déglise et al., 2003). In the honeybees, NO synthase is Ca^{2+} dependent (Müller, 1994) and cholinergic stimulation triggers a Ca^{2+} inward into the cell, through the channel itself or by way of voltage-gated Ca^{2+} channels (David and Sattelle, 1990; Bicker and Kreissl, 1994; Bicker, 1996; Goldberg et al., 1999). This Ca^{2+} inward current could be the link between nicotinic receptors and NO synthase. As suggested by Bicker (1996), we could advance that the intracellular Ca^{2+} concentration increase triggered by α -bungarotoxin-sensitive receptors cause the activation of NO synthase which leads to LTM formation. Indeed, these receptors are blocked by methyllycaconitin and α -bungarotoxin: in the vertebrates both these drugs are known to block a subtype of nicotinic receptors (made of $\alpha 7$ subunits) which gates Ca^{2+} into the cell.

The hypothesis that α -bungarotoxin-sensitive receptors can trigger NO synthesis is supported by the work of Bicker (1996). In this article, this author showed on cultured cells of locusts and honeybees that stimulation of nicotinic receptors lead to an increase of cytoplasmic Ca^{2+} , which causes the activation of NO synthase; this effect was blocked by α -bungarotoxin. Similar results were obtained by Zayas et al. (2002) in cultured nerve cord neurons of larvae of the moth *Manduca sexta*.

Acknowledgments—We thank O. J.-B. Baldanza and L. Ralph for improving the English language; in our laboratory, P. Roulet for

suggestions concerning this work; and M. Giurfa, V. Raymond and J.-C. Sandoz for giving advice on this paper. M. Dacher was funded by the University Toulouse III (bourse ATUPS), the French Agriculture Ministry and a stipend of the Fondation de l'Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques. This research was supported by the Région Midi-Pyrénées (grant 99002824).

REFERENCES

- Bellanger C, Dauphin F, Chichery MP, Chichery R (2003) Changes in cholinergic enzyme activities in the cuttlefish brain during memory formation. *Physiol Behav* 79:749–756.
- Bicker G (1996) Transmitter-induced calcium signalling in cultured neurons of the insect brain. *J Neurosci Methods* 69:33–41.
- Bicker G, Kreissl S (1994) Calcium imaging reveals nicotinic acetylcholine receptors on cultured mushroom body neurons. *J Neurophysiol* 71:808–810.
- Bitterman M, Menzel R, Fietz A, Schäfer S (1983) Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 97:107–119.
- Buckingham S, Lapied B, Le Corronc H, Grolleau F, Sattelle D (1997) Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200:2685–2692.
- Burrell B, Sahley C (2001) Learning in simple systems. *Curr Opin Neurobiol* 11:757–764.
- Cano Lozano V (1997) Study of the role of the cholinergic system in the memorisation processes of the honeybee (Étude du rôle du système cholinergique dans les processus de mémorisation chez l'abeille). PhD thesis, Toulouse University (Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier Toulouse III).
- Cano Lozano V, Armengaud C, Gauthier M (2001) Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J Comp Physiol A* 187:249–254.
- Cano Lozano V, Bonnard E, Gauthier M, Richard D (1996) Mecamylamine-induced impairment of acquisition and retrieval of olfactory conditioning in the honeybee. *Behav Brain Res* 81:215–222.
- Cano Lozano V, Gauthier M (1998) Effects of the muscarinic antagonists atropine and pirenzepine on olfactory conditioning in the honeybee. *Pharmacol Biochem Behav* 59:903–907.
- Colhoun E (1963) The physiological significance of acetylcholine in insects and observations upon other pharmacological active substances. *Avd Insect Physiol* 1:1–46.
- Courjaret R, Lapied B (2001) Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal α -bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptor expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons). *Mol Pharmacol* 60:80–91.
- Couvillon PA, Ferreira TP, Bitterman ME (2003) Delayed alternation in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 117:31–35.
- David J, Sattelle D (1990) Ionic basis of membrane potential and of acetylcholine-induced currents in the cell body of the cockroach fast coxal depressor motor neurone. *J Exp Biol* 151:21–39.
- Déglise P, Grünwald B, Gauthier M (2002) The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the nicotinic receptor of honeybee Kenyon cells. *Neurosci Lett* 321:13–16.
- Déglise P, Dacher M, Dion E, Gauthier M, Armengaud C (2003) Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee. *Behav Neurosci* 117:540–547.
- DeZazzo J, Tully T (1995) Dissection of memory formation: from behavioral pharmacology to molecular genetics. *Trends Neurosci* 18:212–218.
- Dubnau J, Chiang AS, Tully T (2003) Neural substrates of memory: from synapse to system. *J Neurobiol* 54:238–253.
- Erber J, Kierzek S, Sander E, Grandy K (1998) Tactile learning in the honeybee. *J Comp Physiol A* 183:737–744.
- Erber J, Masuhr T, Menzel R (1980) Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiol Entomol* 5:343–358.

- Erber J, Pribbenow B, Bauer A, Kloppenburg P (1993) Antennal reflexes in the honeybee: tools for studying the nervous system. *Apidologie* 24:283–296.
- Erber J, Pribbenow B, Grandy K, Kierzek S (1997) Tactile motor learning in the antennal system of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 181:355–365.
- Estapé N, Steckler T (2002) Cholinergic blockade impairs performance in operant DNMT1 in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 72:319–334.
- Faber T, Joerges J, Menzel R (1999) Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat Neurosci* 2:74–78.
- Fiala A, Müller U, Menzel R (1999) Reversible downregulation of protein kinase A during olfactory learning using antisense technique impairs long-term memory formation in the honeybee, *Apis mellifera*. *J Neurosci* 19:10125–10134.
- Gauthier M, Cano Lozano V, Zaoujal A, Richard D (1994) Effects of intracranial injections of scopolamine on olfactory conditioning retrieval in the honeybee. *Behav Brain Res* 63:145–149.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalksy O, Wüstenberg D, Menzel R (1996) Honeybees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 52:1079–1085.
- Giurfa M, Malun D (2004) Associative mechanosensory conditioning of the proboscis extension reflex in honeybees. *Learn Mem* 11:294–302.
- Giurfa M, Zhang S, Jenett A, Menzel R, Srinivasan M (2001) The concepts of 'sameness' and 'difference' in an insect. *Nature* 410:930–933.
- Goldberg F, Grünewald B, Rosenboom H, Menzel R (1999) Nicotinic acetylcholine currents of cultured Kenyon cells from the mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera*. *J Physiol (Lond)* 514:759–768.
- Granon S, Poucet B, Thinus-Blanc C, Changeux JP, Vidal C (1995) Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology* 119:139–144.
- Gronenberg W (2001) Subdivision of hymenopteran mushroom body calyces by their afferent supply. *J Comp Neurol* 436:474–479.
- Grünbaum L, Müller U (1998) Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci* 18:4384–4392.
- Hammer M (1993) An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in the honeybees. *Nature* 366:59–63.
- Hammer M (1997) The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends Neurosci* 20:245–252.
- Huang ZH, Knowles C (1990) Nicotinic and muscarinic cholinergic receptors in honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Comp Biochem Physiol C* 97:275–281.
- Ihaka R, Gentleman R (1996) R: a language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat* 5:299–314.
- Isabel G, Pascual A, Prétat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304:1024–1027.
- Kevan P (1987) Texture sensitivity in the life of honeybees. In: *Neurobiology and behavior of honeybees* (Menzel R, Mercer A, eds), pp 96–101. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
- Kevan P, Lane M (1985) Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4750–4752.
- Kisch J, Erber J (1999) Operant conditioning of antennal movements in the honeybee. *Behav Brain Res* 99:93–102.
- Kloppenburg P (1995) Anatomy of the antennal motoneurons in the brain of the honeybee (*Apis mellifera*). *J Comp Neurol* 363:333–343.
- Kreissl S, Bicker G (1989) Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *J Comp Neurol* 286:71–84.
- Lansdell S, Millar N (2000) The influence of nicotinic receptor subunit composition upon agonist, α -bungarotoxin and insecticide (imidacloprid) binding affinity. *Neuropharmacology* 39:671–679.
- Mauelshagen J (1993) Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *J Neurophysiol* 69:609–625.
- Menzel R (1985) Learning in honeybee in an ecological and behavioral context. In: *Experimental behavioral ecology* (Hölldobler B, Lindauer M, eds), pp 55–74. Stuttgart: Fischer-Verlag.
- Menzel R (1999) Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 185:323–340.
- Menzel R, Bitterman M (1983) Learning in an unnatural situation. In: *Neuroethology and behavioral physiology* (Huber F, Markl H, eds), pp 206–215. Berlin: Springer-Verlag.
- Menzel R, Giurfa M (2001) Cognitive architecture of a mini-brain: the honeybee. *Trends Cogn Sci* 5:62–71.
- Mehta C, Patel N (1986) Algorithm 643. FEXACT: a FORTRAN subroutine for Fisher's exact test on unordered $r \times c$ contingency tables. *ACM Trans Math Soft* 12:154–161.
- Müller U (1994) Ca^{2+} /calmodulin-dependent nitric oxide synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Eur J Neurosci* 6:1362–1370.
- Müller U (1996) Inhibition of nitric oxide synthase impairs a distinct form of long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Neuron* 16:541–549.
- Müller U (2000) Prolonged activation of cAMP-dependent protein kinase during conditioning induces long-term memory in honeybees. *Neuron* 27:159–168.
- Nader K, Schafe G, Le Doux J (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722–726.
- Oleskevich S (1999) Cholinergic synaptic transmission in insect mushroom bodies in vitro. *J Neurophysiol* 82:1091–1096.
- Page R, Erber J (2002) Levels of behavioural organisation and the evolution of division of labour. *Naturwissenschaften* 89:91–106.
- Pedreira ME, Pérez-Cuesta LM, Maldonado H (2002) Reactivation and reconsolidation of long-term memory in the crab *Chasmagnathus*: protein synthesis requirement and mediation by NMDA-type glutamatergic receptor. *J Neurosci* 22:8305–8311.
- Pedreira ME, Maldonado H (2003) Protein synthesis subserves reconsolidation or extinction depending on reminder duration. *Neuron* 38:863–869.
- Pribbenow B, Erber J (1996) Modulation of antennal scanning in the honeybee by sucrose stimuli, serotonin and octopamine: behavior and electrophysiology. *Neurobiol Learn Mem* 66:109–120.
- Rescorla R (1988) Behavioral studies of Pavlovian conditioning. *Annu Rev Neurosci* 11:329–352.
- Rohrseitz K, Tautz J (1999) Honey bee dance communication: waggle run direction coded in antennal contacts? *J Comp Physiol A* 184:463–470.
- Rybak J, Menzel R (1998) Integrative properties of the Pe1 neuron, a unique mushroom body output neuron. *Learn Mem* 5:133–145.
- Sandoz JC, Roger B, Pham-Delègue MH (1995) Olfactory learning and memory in the honeybee: comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *CR Acad Sci Paris III* 318:749–755.
- Sara S (2000) Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem* 7:73–84.
- Scheidler A, Kaulen P, Brüning G, Erber J (1990) Quantitative autoradiographic localization of [^{125}I] α -bungarotoxin binding sites in the honeybee brain. *Brain Res* 534:332–335.
- Scheiner R, Page R, Erber J (2001a) Responsiveness to sucrose affects tactile and olfactory learning in preforaging honeybees of two genetic strains. *Behav Brain Res* 120:67–73.
- Scheiner R, Page R, Erber J (2001b) The effects of genotype, foraging role, and sucrose responsiveness on the tactile learning performance of honeybees (*Apis mellifera* L.). *Neurobiol Learn Mem* 76:138–150.

- Sharples C, Wonnacott S (2001) Neuronal nicotinic receptors. *Trends Neurosci* 24:1–12.
- Stollhoff N, Eisenhardt D, Menzel R (2003) Extinction and reconsolidation in the honeybee *Apis mellifera*: two interfering processes? In: *Proceedings of the 5th meeting of the German Neuroscience Society* (Eisner N, Zimmermann H, eds), p 698. New York: George Thome Verlag.
- Thany SH, Lenaers G, Crozatier M, Armengaud C, Gauthier M (2003) Identification and localization of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 3$ mRNA in the honeybee brain *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol* 12:255–262.
- Tomizawa M, Casida J (2001) Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag Sci* 57:914–922.
- Zayas R, Qazi S, Morton D, Trimmer B (2002) Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathways in insect neurons. *J Neurochem* 83:421–431.

(Accepted 6 September 2004)

ERRATUM TO “ANTENNAL TACTILE LEARNING IN THE HONEYBEE: EFFECT OF NICOTINIC ANTAGONISTS ON MEMORY DYNAMICS” [Neuroscience 130 (1) 37–50]

M. DACHER,* A. LAGARRIGUE AND M. GAUTHIER

Centre de Recherches sur la Cognition Animale, CNRS UMR 5169, Université Paul Sabatier, Bât 4R3, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, Cedex 04, France

The publisher regrets an error in the caption of Fig. 6. The correct caption is printed below.

Fig. 6. Control experiment (experiment 9). This experiment is a replication of experiment 7 (Fig. 5A), but with three more groups, injected either with α -bungarotoxin, mecamylamine or saline solution; these three additional groups just received sucrose solution rather than full training. Numbers in parentheses are the number of animals used; nc indicates that this group is not conditioned (and therefore has no learning curve). * Significant difference between the three groups (Fisher's exact test, $P < 0.050$). ** Significant difference between the six groups (Fisher's exact test, $P < 0.010$). *** Significant difference between the six groups (Fisher's exact test, $P < 0.001$).

doi of original article 10.1016/j.neuroscience.2004.09.006

*Corresponding author. Tel: +33-561-557-582; fax: +33-561-556-154.
dacher@cict.fr

0306-4522/05\$30.00+0.00 © 2005 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.neuroscience.2004.12.001

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Pharmacology, Biochemistry and Behavior xx (2005) xxx – xxx

**PHARMACOLOGY
BIOCHEMISTRY
AND
BEHAVIOR**
www.elsevier.com/locate/pharmbiochembeh

Effects of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*)

Abdessalam Kacimi El Hassani, Matthieu Dacher, Monique Gauthier, Catherine Armengaud*

Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier Toulouse III-CNRS UMR 5169,
118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse Cedex 04, France

Received 16 September 2004; received in revised form 12 July 2005; accepted 13 July 2005

Abstract

Fipronil is a phenylpyrazole insecticide introduced for pest control, but it can also affect non-target insects such as honeybees. In insects, fipronil is known to block GABA receptors and to inhibit ionotropic glutamate-gated chloride channels, but the behavioral effects of low doses are not yet fully understood. We have studied the effect of sublethal doses of fipronil on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*) under controlled laboratory conditions. The drug was either administered orally or applied topically on the thorax. A significant reduction of sucrose sensitivity was observed for the dose of 1 ng/bee 1 h after a thoracic application. No significant effect on sucrose sensitivity was obtained with acute oral treatment. A lower dose of fipronil (0.5 ng/bee applied topically) impaired the olfactory learning of the honeybees. By contrast, locomotor activity was not affected. Our results suggest a particular vulnerability of the olfactory memory processes and sucrose perception to sublethal doses of fipronil in the honeybee.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Apis mellifera*; Fipronil; Memory; Proboscis extension response (PER); Locomotor activity; Sucrose sensitivity; Phenylpyrazole insecticide; Insect

1. Introduction

Fipronil is a second-generation phenylpyrazole insecticide widely used in veterinary medicine. It has excellent therapeutic and persistent activity against ticks and fleas when topically administered to domestic animals (Hainzl and Casida, 1996). As fipronil is also effective at low doses against numerous terrestrial insects such as insect pests of crops (Balanca and de Visscher, 1997), it is also used as a pesticide. However, fipronil is highly toxic to non-target insects and the LD 50 on honeybees is very low (Tingle et al., 2003: 4 ng/bee, Decourtye, 2002: 6.2 ng/bee). Besides the well-documented toxicity of fipronil to insects, little is known about the physiological and behavioral effects on honeybees of sublethal doses of fipronil, which bees may encounter during their foraging.

This is a major concern as in the South of France there has been a depopulation of hives that could not be accounted for by high mortality, but which occurred after seasons where bees were foraging on sunflowers whose seeds were coated with fipronil. Therefore testing on non-target species is particularly important to determine the suitability of fipronil-based products for registration in different countries or habitats and the potential associated risks to non-target wildlife.

Fipronil is a potent inhibitor of the gamma-aminobutyric acid (GABA)-gated chloride channel (Cole et al., 1993). It triggers hyper-excitation, convulsions and paralysis that cause insect death. Indeed, GABA is an important inhibitory neurotransmitter in invertebrates (Rauh et al., 1990; Sattelle, 1990). GABA-like immunoreactive neurons are widely distributed in the bee brain (Bicker, 1999) and are also clustered within the thorax ganglion of the hymenoptera and orthoptera (Witten and Truman, 1998; Wildman et al., 2002). GABA receptors have been identified in the visceral muscle of the cockroach (Moss and Miller, 1988). In locust

* Corresponding author. Tel.: +33 561 556 436; fax: +33 561 558 444.
E-mail address: carmenga@cict.fr (C. Armengaud).

muscles, GABA receptors resembled those of the motor neuron cell body in their different sensitivity to the vertebrate GABA antagonists picrotoxin and bicuculline (Fraser et al., 1990). Hence, blocking GABA receptors in insects with fipronil could impair locomotor activity.

Several lines of evidence indicate that GABA mediates, in vertebrates, the processing of taste information at each level from the periphery to the cerebral cortex (Yamamoto et al., 1998) and is also involved in olfaction in invertebrates (Bazhenov et al., 2001). In honeybees, picrotoxin disrupts discrimination of molecularly similar odorants but not of dissimilar odorants (Stopfer et al., 1997), whether the treatment occurred before conditioning or before testing (Hosler et al., 2000), and similarly fipronil intoxication of the honeybee could impair olfactory perception. We advance the hypothesis that fipronil at sublethal doses can affect gustatory perception, olfactory learning and motor function in the honeybee. These functions are essential to the bees as they are necessary in foraging behavior. Indeed, sucrose sensitivity is important for making foraging decisions (Pankiw and Page, 1999) and organizing the division of labor within the hive (Page and Erber, 2002). Moreover, in the course of foraging, a learning process occurs during which floral features (i.e. odor, color, and shape) are associated to the nectar reward (Menzel, 1999).

Sucrose sensitivity assays, olfactory conditioning of the proboscis extension response (PER) and recording of locomotor activity can be used to assess the sub-lethal effect of pesticides on the honeybee (Lambin et al., 2001; Decourtye et al., 2004a,b). The purpose of this study was to examine under laboratory conditions the effects of acute sublethal doses of orally absorbed or topically applied fipronil on (1) locomotor activity, (2) sucrose sensitivity and (3) olfactory learning.

2. Material and methods

2.1. Animals

The experiments (locomotor activity, PER induced by antennae sucrose stimulation and olfactory learning) were carried out from September 2003 to February 2005. Worker honeybees were caught through a hole at the top of the hive set in an apiary warmed to 27 °C. Bees were kept for less than 1 h with ad libitum sucrose solution (40% wt/v) in small Plexiglas boxes until being used for a single experiment. For PER to sucrose and the olfactory learning experiments, bees were individually anaesthetized by cooling. Then they were fixed into a small tube with a drop of wax-colophane mixture (9 g and 4 g, respectively) laid on the dorsal part of the thorax and the tube's wall. For locomotor experiments, bees caught from the hive were maintained in the Plexiglas box until they were individually tested for motor activity. Then the test bees received oral or

topical application of fipronil and were kept starved in a 5-ml syringe for 1 h until the test for motor activity. The experimental procedures were in compliance with the European laws on the use of animal subjects.

2.2. Treatment

Fipronil (Cluzeau Info Labo, Sainte-Foy-La-Grande) was dissolved in acetone and diluted either in water for topical application or in sucrose solution for oral treatment. The doses tested were sublethal and inferior or equal to LD 50/5. The final concentration of acetone in sucrose and watery solutions was equal to 0.1% (vol./vol.). The oral treatment consisted in administering (using a 20- μ l pipette) 10 μ l of sucrose solution (40% wt/v) containing vehicle (0.1% acetone) or fipronil at 0.1, 0.5 or 1 ng/bee to each honeybee. An additional experiment with fipronil at 0.01 ng/bee orally administered was conducted for PER to sucrose and olfactory learning investigations following a pilot experiment suggesting an effect only for the lower doses. The animals did not react to the presence of acetone or fipronil and eagerly drank the sucrose solution. For topical application, 1 μ l of vehicle (0.1% acetone) alone or containing fipronil (0.1, 0.5 or 1 ng/bee) was applied to the thorax of the bee with a 2- μ l pipette.

2.3. Locomotor activity

Locomotor activity was analyzed as previously described (Lambin et al., 2001). The motor activity can be recorded using an open-field like apparatus allowing observation of bee vertical displacements. This test does not reflect the flying ability of the animals, however it is relevant to access motor function of walking bees because pesticides often disturb this function. The effect of fipronil on locomotor activity was studied 60 min after a single topical application or oral dose. Bees were individually introduced into a 5-ml syringe where they were subjected to a starvation period of 60 min. The animals were then restrained by pushing the plunger of the syringe and they received topical or oral administration of fipronil. Honeybees were tested in a PVC open-field-like apparatus (length: 30 cm, height: 30 cm, depth: 4 cm) stood vertically and illuminated from above. The glass front allowed observation and the PVC back area was divided into 30 squares (6 horizontal levels of 5 cm high); with each level divided into squares of 5 \times 5 cm. The syringe containing the bee was introduced at the bottom right-hand side, a trap door was opened and the bee was allowed to move inside the box for a 3-min observation period. Bees walked from the bottom to the top of the open-field, and some of them tried to fly by remaining in contact with the walls. The position of the animal in a square was recorded every 5 s with a computer. Variables assessed for each animal were the total length walked, the duration of immobility, the number of ascents from one level to a higher one and the

time spent in each of the six levels of the apparatus. These last two parameters were chosen as indicators of geotaxis or phototaxis.

2.4. Sucrose sensitivity

The PER can be used to assess sucrose sensitivity (for a review, see Scheiner et al., 2004). Extension of the proboscis is reflexive in response to antennal stimulation with solutions of sucrose. In the current experiments, the PER was used to evaluate the bees' sensitivity to ascending concentrations of sucrose solution (ACSS) and to examine the dose-dependent component of oral and topical applications of fipronil on sucrose responsiveness. For each concentration of sucrose solution, the proportion of animals releasing a PER was calculated. Each animal was tested twice with the ACSS: 60 min prior and 60 min after treatment. Prior to each ACSS, the bees consumed 10 μ l of sucrose solution; they were then starved for two periods of 1 h separated by 10 μ l of sucrose consumption. This protocol gave the same duration of starvation for topical and oral experiments; in this latter case fipronil was given in the 10 μ l sucrose solution. The effect of thirst on sucrose sensitivity was controlled, by allowing bees responding to water to drink water (10 μ l) 1 h before the presentation of ACSS. Concentrations of sucrose solution increased in a \log_{10} series of -1.5 , -1.0 , -0.5 , 0.0 , 0.5 , 1.0 , and 1.5 corresponding to sucrose concentrations of 0.03%, 0.1%, 0.3%, 1%, 3%, 10% and 30% (w/v). Solutions were applied to the antennae with a 1-min inter-trial interval. Only bees presenting no response to water 1 min before the lowest sucrose concentration were included in the statistical analysis of the PER to sucrose.

2.5. Olfactory learning and memory

This kind of learning can be studied under controlled laboratory conditions by using olfactory Pavlovian conditioning of the PER (Bitterman et al., 1983; Menzel, 1999), which is relevant to the situation bees encounter during their foraging trips (Gerber et al., 1996). Oral or topical treatments were performed 3 h prior to conditioning because 3 h starvation is necessary to enhance the motivational state of the animals.

Classical olfactory conditioning was carried out as previously described by Gerber et al. (1998) and Deglise et al. (2003). The five-trial paradigm with an inter-trial interval of 1 min, which leads to long-term memory, was used. In this experiment, honeybees were trained to associate the conditioned stimulus (CS) represented by a coffee odor with an unconditioned stimulus (US) represented by a drop of sucrose (40% wt/v) applied to the antennae. The CS and the US lasted 3 s, and the US delivery started one second before the end of the CS. The bees were allowed to feed only during the fifth trial of the training

phase. In the testing trials, the CS was presented alone 1 h, 24 h and 48 h after the learning session. The proportion of animals releasing a conditioned PER was calculated during learning and retrieval. Daily experiments including bees subjected to fipronil (0.1, 0.5, 1 ng/bee for topical application and 0.01, 0.1, 0.5, 1 ng/bee for oral administration) and control bees were repeated at least 3 times with at least four bees for each condition. Bees were fed with sucrose solution twice a day with at least a delay of 1 h after learning or retrieval.

2.6. Data analysis

For the locomotor activity, the nine variables recorded were transformed with natural logarithms or square roots to reach a normal distribution. Analysis of variance (ANOVA) was conducted to analyze the results, using the factor treatment (oral or topical with the four concentrations). As the pairwise Scheffé or Tukey post-hoc tests did not yield any significant result, we used contrast comparison to compare the oral administration group with the topical administration group.

The PER rates to the different sucrose solutions were compared within the eight treatment groups using a McNemar test (with binomial distribution). For the olfactory learning performances comparison the Fisher exact test was used to compare the different doses. When the p -values were significant, we performed pairwise comparisons between all groups. As this involves multiple comparisons (which could artificially decrease the α risk), the p -values obtained were corrected using the technique of Holm. All the tests were two-tailed. A difference was considered to be significant when the p -value obtained was lower than 0.050. ANOVA and Mc Nemar tests were performed with SPSS12 (SPSS Science, Chicago, USA). Fisher's exact test was performed with R2.0 (R Development Core Team, 2004); R provides algorithms to compare more than two groups with Fisher's exact test.

3. Results

3.1. Locomotor activity

When introduced in the vertical open-field, honeybees tend to migrate upward against the force of gravity to the light source. This behavior could be defined as negative geotaxis or positive phototaxis. During the 3 min of observation, we evaluated the number of ascents performed (i.e. passing from one level to another higher level; data not shown), the distance covered (Fig. 1A), the duration of immobility (Fig. 1B) and the time spent within each one of the six levels of the apparatus (Fig. 1C).

The first three parameters were significantly different across the different treatments (one-way ANOVA, number of ascents: $F_{7, 108}=2.360$, $p=0.028$; immobility duration:

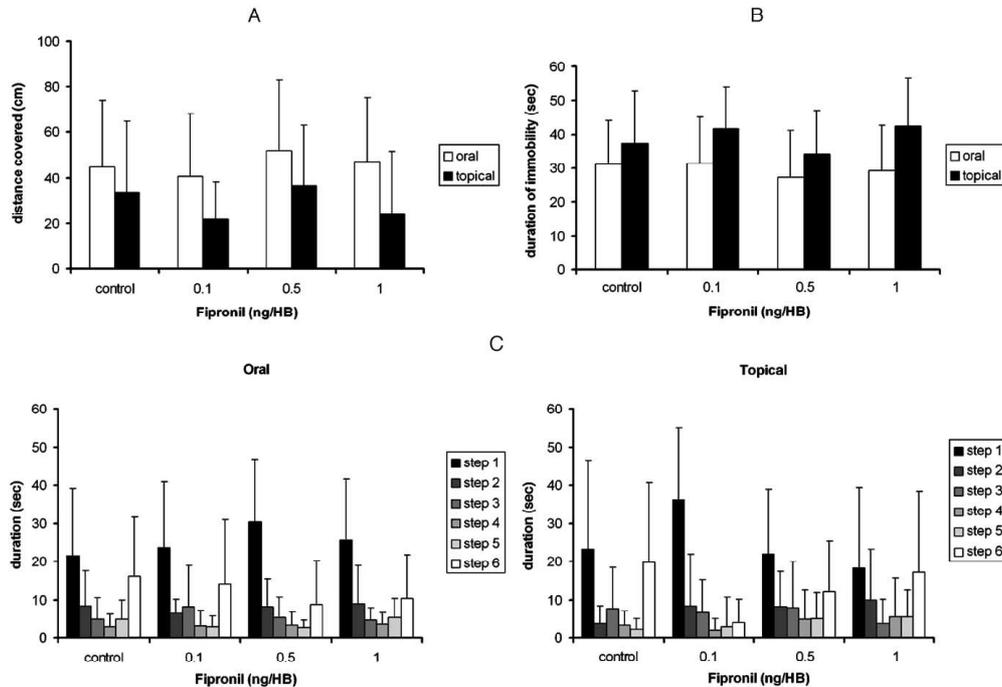


Fig. 1. Locomotor activity of honeybees 1 h after fipronil thoracic application or oral absorption. Results represent the distance covered (A), the duration of immobility (B) and the time spent in each level (C). Columns and vertical bars represent means \pm SEM. Number of animals used are: topical, 0.1 ng: 14; topical, 0.5 ng: 13; oral, 0.5 ng: 14; other groups: 15.

$F_{7, 108}=2.459, p=0.022$; distance covered: $F_{7, 108}=2.936, p=0.007$). On the other hand, there were no differences between the time spent within each level (one-way ANOVA, level 1: $F_{7, 108}=1.573, p=0.151$; level 2: $F_{7, 108}=1.349, p=0.235$; level 3: $F_{7, 108}=0.659, p=0.706$; level 4: $F_{7, 108}=0.544, p=0.799$; level 5: $F_{7, 108}=1.188, p=0.316$; level 6: $F_{7, 108}=1.405, p=0.211$). To assess the origin of the differences, we compared each treatment with all the others, using Tukey or Scheffé pairwise post-hoc tests, but no differences were seen. Therefore, we performed contrasts comparison, i.e. comparing one group of means versus another group. A significant difference was revealed between orally-treated and topically-treated animals, whatever the fipronil concentration used (contrasts test: number of ascents: $T_{108}=-3.285, p=0.0014$; immobility duration: $T_{108}=3.589, p=5.0 \times 10^{-4}$; distance covered: $T_{108}=-3.875, p=1.8 \times 10^{-4}$).

These results indicated that fipronil had no effect on locomotor activity whatever the route of its administration. Fipronil did not affect the honeybees' ability to move inside the apparatus. However, the method of pesticide application employed (oral or topical) had an effect on the animals' behavior. Putting a drop of solution a bees' thorax induced a

reduction in mobility compared with the locomotor activity of the animals that drank the same volume of solution. A mechanical constraint has been evoked to explain this observation.

3.2. Sucrose sensitivity

One hour before treatment, the responsiveness to water was tested in control and fipronil-treated bees; animals that presented a PER to water before the first ACSS were not taken into account for sucrose sensitivity analysis. In the control groups, the sucrose sensitivity was not modified by acetone 1 h after an oral administration or a topical application (McNemar tests, $p>0.050$, Fig. 2A–B). Orally absorbed fipronil had no significant effect on sucrose responsiveness to the 4 doses tested (McNemar tests, $p>0.050$, Fig. 2A). However, a nearly significant decrease was observed for the 1% sucrose solution after treatment with 0.01 ng of fipronil (McNemar tests, $p=0.070$) and for the 0.3% sucrose solution after treatment with 0.5 ng of fipronil (McNemar tests, $p=0.063$). By contrast, 1 h after 1 ng of fipronil was topically applied, a significant decrease of the PER to sucrose solutions was observed for the 0.1% and

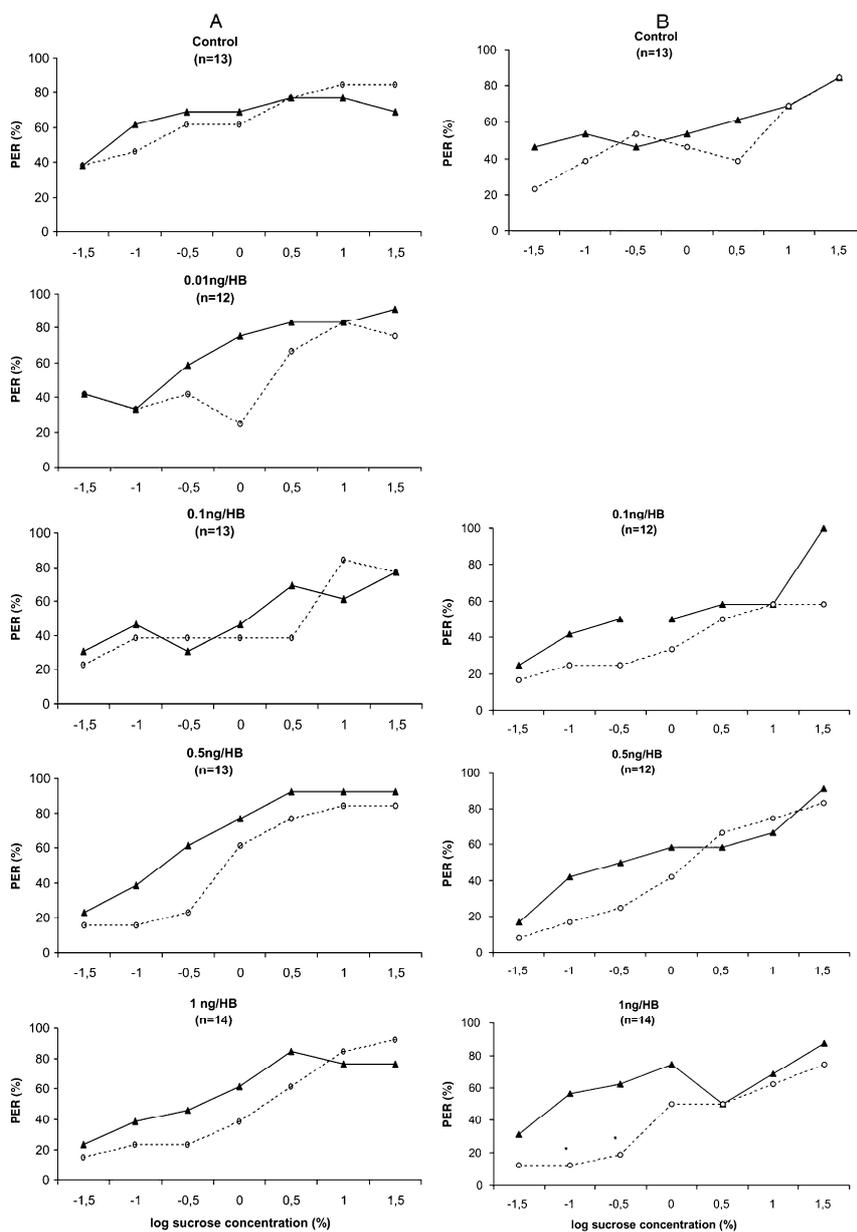


Fig. 2. Sucrose-concentration response curves of oral (A) and topical (B) fipronil treated bees. Bees were tested twice: 1 h before treatment (black line) and 1 h after treatment (dotted line). Abscissa indicates sucrose concentrations (0.03%, 0.1%, 0.3%, 1%, 3%, 10%, 30%) in logarithmic scale. * $p < 0.05$ McNemar test, compared to before treatment.

0.3% sucrose solutions (McNemar tests, $p=0.039$ and $p=0.039$, respectively). For sucrose concentrations higher than 0.3% no more modification of sucrose responsiveness was observed (McNemar test, $p>0.050$, Fig. 2B). For lower doses of fipronil, no significant decrease of sucrose sensitivity was observed (McNemar test, $p>0.050$), though 0.1 ng of fipronil induced a nearly significant decrease of the PER for the 30% sucrose solution (McNemar test, $p=0.063$, Fig. 2B).

3.3. Olfactory learning and memory

Orally absorbed fipronil induced no significant impairment of learning and retention performances (Fig. 3A). A moderate but not significant decrease of performance was observed at the fourth acquisition trial with the fourth dose tested (Fisher exact test: $p>0.05$). One hour after training, the 0.01 ng group exhibited a non-significant decrease in retention. Retention tested 24 h and 48 h after learning was

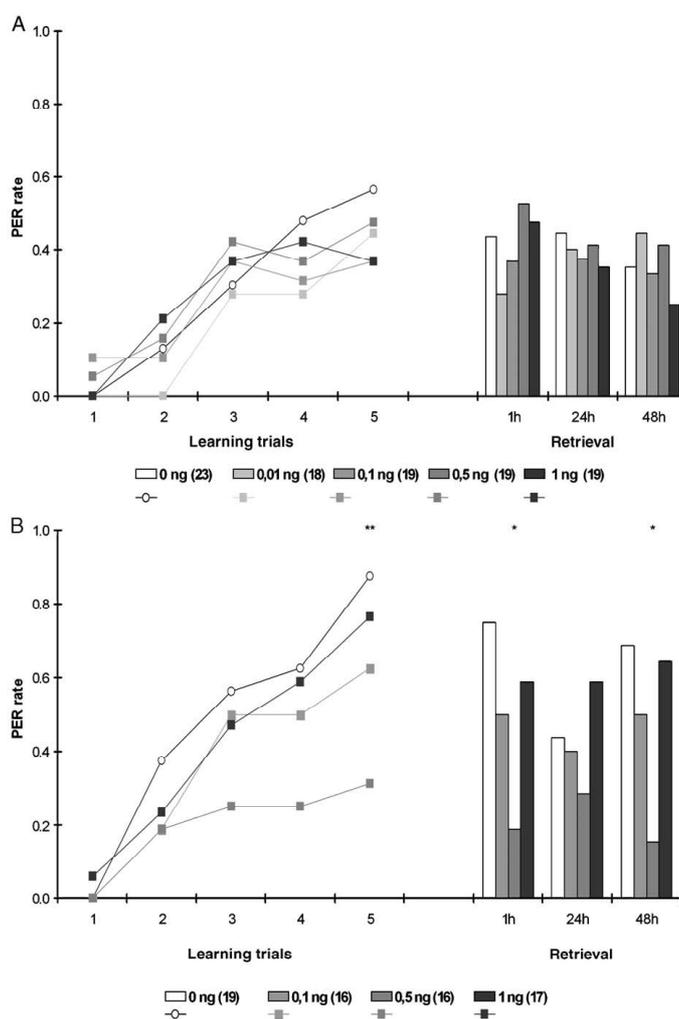


Fig. 3. Olfactory learning performances of bees 3 h after an oral (A) or topical (B) fipronil treatment. Retention performances of the same animals were tested 1 h, 24 h and 48 h after learning. The control and fipronil treated groups were run in parallel. *: The four groups are different ($p<0.050$, Fisher exact test); **: The four groups are different ($p<0.010$, Fisher exact test).

not significantly impaired in the treated groups (Fisher exact test: $p > 0.05$).

Topical treatment induced an effect on learning according to the dose used. Indeed, as can be seen in Fig. 3B, the 0.5 ng dose impaired the animal's performance whereas 0.1 ng or 1 ng did not differ from control group. This is particularly clear in the 5th learning trial, where the four groups (control, 0.1 ng, 0.5 ng and 1 ng) are different (Fisher's exact test, $p = 0.006$). The 0.5 ng dose differed from control group (Fisher's exact test, $p = 0.019$, adjusted by Holm's method) whereas the other doses did not significantly differ when compared to each other or to the control (Fisher's exact test, $p > 0.050$, adjusted by Holm's method). The same holds true during retrieval tests performed 1 h after learning, i.e. 4 h after treatment (Fisher's exact test, $p = 0.011$; 0.5 vs. control, $p = 0.023$, adjusted by Holm's method; other pairwise comparisons, $p > 0.050$, adjusted by Holm's method) or 48 h after learning; i.e. 51 h after treatment (Fisher's exact test, $p = 0.021$; 0.5 vs. control, $p = 0.047$, adjusted by Holm's method; other pairwise comparisons, $p > 0.050$, adjusted by Holm's method). Though performance was similar among the four groups, 24 h after retrieval or during acquisition (Fisher's exact test, $p > 0.050$) the same pattern of performance was observed. Thus, topical application of 0.5 ng fipronil impaired the formation of the memory trace, but lower or higher doses did not significantly affect learning processes.

At the end of the experiment, all the bees were tested for the PER induced by sucrose stimulation of the antennae. No significant impairment of the PER to sucrose (40%) was observed over a 48-h period. This indicated that topical and oral fipronil treatments neither affected motor response nor sucrose (40%) perception during the 48-h period observation.

3.4. Mortality

During the three experiments, the number of dead bees was counted. The significant effects of fipronil on the PER to sucrose 1 h after a thoracic application and on olfactory memory tested up to 27 h after treatment were not associated with differential mortality among the different groups. Indeed, the treatment with fipronil topically applied or orally administered did not lead to additional mortality during this observation period. However, 48 h after topical treatment, the mortality was significantly different across the three groups (Fisher exact test: $p < 0.05$). Moreover, no difference was found between the different fipronil treated groups on the mortality rate (Fisher exact test: $p > 0.05$) whereas no mortality was observed in acetone control group. Hence, fipronil treated groups exhibited higher mortality than the control group 48 h after a thoracic application.

Forty-eight hours after oral treatment fipronil induced an increase of mortality compared to control group (58% vs. 21%, Fisher exact test: $p = 0.04$). The dose of 0.5 ng leads to

a non-significant (Fisher exact test: $p > 0.05$) increase of mortality (19%) 48 h after oral absorption.

The LD 50 proposed by Decourtye (2002) was obtained by feeding groups of 20 bees with 200 μ l of glucose syrup containing different doses of fipronil. By comparison with this oral contamination of group of bees, individual contamination seems to be more toxic. Although our experiments are not designed to calculate a LD 50 but a lethal time for a given dose, they indicate that the LD 50 for fipronil absorbed by harnessed bees is lower than 5 ng/bee.

4. Discussion

This report presents a behavioral analysis of the effect of fipronil on locomotor activity, sucrose gustatory sensitivity and on olfactory learning and memory in the honeybee. Results described here concerned acute oral and contact exposure of adult honeybees to fipronil. We were interested in the sublethal effect of the pesticide because subtle effects on bees' physiology or behavior may affect the honeybee population. The fipronil effects observed in our study were complex because they depended on the function studied, the dose tested and the way the pesticide was administered (oral vs. topical). Oral administration, which implicates digestive metabolism, induced less or lighter effects. Also, there was no clear dose–effect relationship on learning and memory functions.

4.1. Locomotor activity

Locomotor activity of the honeybee was not affected by fipronil at the doses given and for the short periods of time tested. We have previously observed with the same open-field test that the insecticide imidacloprid induced opposite effects on motor activity depending on the dose (Lambin et al., 2001). Sixty minutes after a 2.5 ng imidacloprid topical application, honeybees lost their ability to move in the open-field whereas 1.25 ng induced an increase of locomotor activity.

The absence of an effect of fipronil on locomotor activity was surprising because GABAergic signaling networks within the central nervous system play an important role in modulating locomotor activity in insects. Indeed, GABA is present at the peripheral inhibitory neuromuscular junction of locust extensor-tibiae muscle fibers (Usherwood and Grundfest, 1965). In addition, feeding adult female flies with a yeast-sucrose medium containing GABA transport inhibitors, resulted in diminished locomotor activity, deficits in geotaxis, and the induction of convulsive behavior with a secondary loss of the righting reflex (Leal and Neckameyer, 2002). As fipronil's main target is GABAergic signaling, we first hypothesized that fipronil would have an effect on locomotion. It might be supposed that a longer delay between treatment and test would lead to a significant impairment of locomotor activity. Another explanation

could be that the dose necessary to achieve this impairment is too close to the lethal dose. In this case, it would not be possible to observe any effect on motor function without affecting the survival of the animal (which was the purpose of the present study and is relevant to the situation encountered in the South of the France).

4.2. PER to sucrose

The data presented indicated that the fipronil effects on the sucrose-elicited PER were greater after topical application than after oral administration. The significant decrease of the PER for animals that received a topical application of 1 ng fipronil was observed for low sucrose concentrations. Hence the perception of a sugar solution of low concentrations was reduced by this treatment.

The responsiveness of bees to sucrose is an important indicator of honeybee foraging decisions. By offering increasing concentrations of sucrose and determining the concentration that elicits proboscis extension, one can determine the response threshold of an individual bee (Scheiner et al., 2004). Using this technique Page et al. (1998) determined that pollen and nectar foragers perceive the concentration of sucrose differently. Pollen foragers have lower sucrose response thresholds than nectar foragers (Pankiw and Page, 1999). Workers with the lowest response threshold became water foragers, followed with increasing response thresholds by pollen foragers, nectar foragers, bees collecting both pollen and nectar, and finally those returning to the colony empty (Pankiw et al., 2001). Following our results, it can be suggested that pollen foragers would be more affected by fipronil than nectar foragers, because they have a low sucrose response. As sucrose sensitivity is a critical parameter in organizing the division of labor (Page and Erber, 2002), fipronil could be harmful for hives as sublethal doses would prevent a proper organization of hive work.

In addition, we cannot exclude an effect of fipronil on amino acid gustatory perception of the bees. Indeed, some insects (i.e. beetles) possess sensory receptors that respond to GABA (Mullin et al., 1994). These receptors could be a target for fipronil.

4.3. Effect of fipronil on learning and memory

Our behavioral results indicated that fipronil at a sublethal doses (topical 0.5 ng per animal) modified the acquisition and retention performances tested in the conditioned PER paradigm. The impairment of retention observed 4 h after the treatment (1 h after acquisition) was most likely due to the impairment of memory formation rather than retrieval. This effect on retention performance was neither associated to a decrease of sucrose sensitivity nor to a toxic effect of fipronil. This effect could not be due to a lower sensitivity to sucrose; in the opposite case the unconditioned stimulus would be powerless. In fact, we

have shown that the topical dose of 0.5 ng per animal was without effect on the PER to sucrose and no significant mortality was observed with this dose over 24 h. Furthermore, one can exclude an impairment on olfactory perception, as this would have been observed consistently for all learning trials and retrieval tests, which was not the case for any of the doses.

Insect ionotropic GABA receptors are the target of numerous insecticides especially fipronil. In crickets, GABA levels increased in the haemolymph during learning (Jaffe et al., 1992). This suggests an involvement of this neurotransmitter in the learning processes. Moreover, electrophysiological recordings indicated that GABA inhibition of the Kenyon cells could play a role on the odor-evoked oscillation patterns observed in the mushroom bodies (MacLeod and Laurent, 1996; Stopfer et al., 1997). It can be postulated that the impairment of learning and memory performance after fipronil was associated to an inhibition of ligand-gated chloride channels involved in GABA transmission. Blocking the actions of fipronil on glutamate-induced Cl^- currents has been studied in cockroaches (Raymond et al., 2000; Ikeda et al., 2003; Zhao et al., 2004) and honeybees (Barbara et al., 2003). In honeybees the glutamatergic transmission seemed also to be involved in memory processes (Maleszka et al., 2000). The vertebrate NMDA receptor antagonist: MK-801, and the glutamate transporter inhibitor: L-trans-2,4-PDC, used both with pretraining and pretesting injections lead to an impairment of long-term (24 h) memory. However these treatments had no effect on short-term (1 h) memory of an olfactory task (Si et al., 2004). Thus the effects of fipronil could be attributed to the multiple cellular targets of this pesticide, including non-desensitizing glutamate-gated chloride channels (Zhao et al., 2004). In addition, fipronil sulfone is rapidly formed from fipronil in biological systems and plays a major role in its toxicity. Fipronil can also be converted into the photoproduct desulfinyl fipronil which is generally more toxic and more potent at the chloride channel than the sulfone (Hainzl et al., 1998). Fipronil photoconversion is enhanced with topical application and limited with oral consumption. This process could explain the differences in the results observed between these two kinds of administration.

4.4. Conclusion

Fipronil blocks glutamate-gated chloride channels in the cockroach (Ikeda et al., 2003) and the honeybee (Barbara et al., 2003); our results indicated that ligand-gated chloride channels are involved in learning and memory in the honeybee. An interesting aspect of these results is the non-linear effect on behavior of increasing concentrations of fipronil, a result already observed with imidaclopride, a neonicotinic insecticide (Lambin et al., 2001). It could be suggested that fipronil affects different receptors with a different affinity for each of them. The lowest concentration

of fipronil could block a first receptor, triggering the behavioral effects; then a higher concentration would block another receptor which would antagonize the effects of the first one. Glutamate and GABA receptors could be potential candidates. Alternatively, this non-linear effect could also be triggered by different metabolites of fipronil.

Testing fipronil on honeybees under laboratory conditions was particularly important to determine the suitability of fipronil-based products for registration, and to evaluate the potential associated risks to non-target wildlife. However, the transposition of acute effects observed on restrained bees to free-flying bees that encountered fipronil on crops needs two other kind of experiments: (1) chronic fipronil treatment under laboratory condition, and (2) field experiments. Our results provide a framework for these experiments.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the French Ministry of Agriculture (no. 407, ONIFLHOR). We thank Sandrine Paute and Vincent Garry for technical assistance and Michel Lambin for his advice on the locomotion experiments.

References

- Balana G, de Visscher M. Impacts on non-target insects of a new insecticide compound used against the desert locust [*Schistocerca gregaria* (Forskål 1775)]. *Arch Environ Contam Toxicol* 1997;32:58–62.
- Barbara G, Zube C, Rybak J, Gauthier M, Grünwald B. Ionotropic receptors of cultured honey bee antennal lobe neurons. In: Eisner N, Zimmermann H, editors. Proceedings of the 5th meeting of the German neuroscience society. New York: George Thyme Verlag Stuttgart; 2003. p. 856–7.
- Bazhenov M, Stopfer M, Rabinovich M, Abarbanel HD, Sejnowski TJ, Laurent G. Model of cellular and network mechanisms for odor-evoked temporal patterning in the locust antennal lobe. *Neuron* 2001;30:569–81.
- Bieker G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc Res Technol* 1999;45:174–83.
- Bitterman ME, Menzel R, Fietz A, Schäfer S. Classical conditioning proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J Comp Psychol* 1983;97:107–19.
- Cole LM, Nicholso RA, Casida JE. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pestic Biochem Physiol* 1993;46:47–54.
- Decourtye A. Etude de l'impact des produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). PhD Thesis University Paris, X.I., d'Orsay 2002.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, Devillers J, Cluzeau S, Gauthier M, et al. Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pestic Biochem Physiol* 2004a;78:83–92.
- Decourtye A, Devillers J, Cluzeau S, Charreton M, Pham-Delegue MH. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004b;57:410–9.
- Deglise P, Dacher M, Dion E, Gauthier M, Armengaud C. Regional brain variations of cytochrome oxidase staining during olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Behav Neurosci* 2003;117:540–7.
- Fraser SP, Djamgoz MBA, Usherwood PNR, O'Brien J, Darlison MG, Barnard EA. Amino acid receptors from insect muscle: electrophysiological characterization in *Xenopus* oocytes following expression by injection of mRNA. *Mol Brain Res* 1990;8:331–41.
- Gerber B, Geberzahn N, Hellstern F, Klein J, Kowalksy O, Wüstenberg D, et al. Honeybees transfer olfactory memories established during flower visits to a proboscis extension paradigm in the laboratory. *Anim Behav* 1996;52:1079–85.
- Gerber B, Wüstenberg D, Schutz A, Menzel R. Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: non-monotonous effects of the training trial interval. *Neurobiol Learn Mem* 1998;69:71–8.
- Hainzl D, Casida JE. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:12764–7.
- Hainzl D, Cole LM, Casida JE. Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chem Res Toxicol* 1998;11:1529–35.
- Hosler JS, Buxton KL, Smith BH. Impairment of olfactory discrimination by blockage of GABA and nitric oxide in the honey bee antennal lobes. *Behav Neurosci* 2000;114:514–25.
- Ikeda T, Zhao X, Kono Y, Yeh JZ, Narahashi T. Fipronil modulation of glutamate-induced chloride currents in cockroach thoracic ganglion neurons. *Neurotoxicology* 2003;24:807–15.
- Jaffe K, Blau S, Zabala N. Amino acid levels during learning and memory consolidation of an aversive conditioning task in crickets. *Pharmacol Biochem Behav* 1992;43:205–14.
- Lambin M, Armengaud C, Raymond S, Gauthier M. Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Arch Insect Biochem Physiol* 2001;48:129–34.
- Leal SM, Neckameyer WS. Pharmacological evidence for GABAergic regulation of specific behaviors in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 2002;50:245–61.
- MacLeod K, Laurent G. Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* 1996;8:976–9.
- Maleszka R, Helliwell P, Kucharski R. Pharmacological interference with glutamate re-uptake impairs long-term memory in the honeybee, *Apis mellifera*. *Behav Brain Res* 2000;115:49–53.
- Menzel R. Memory dynamics in the honeybee. *J Comp Physiol A* 1999;185:323–40.
- Moss JI, Miller TA. A pharmacological study of the hyperneural muscle of *Periplaneta americana*. *J Insect Physiol* 1988;34:997–1003.
- Mullin CA, Chyb S, Eichenseer H, Hollister B, Frazier JL. Neuroreceptor mechanisms in insect gustation: a pharmacological approach. *J Insect Physiol* 1994;40:913–31.
- Page R, Erber J. Levels of behavioural organisation and the evolution of division of labour. *Naturwissenschaften* 2002;89:91–106.
- Page RE, Erber J, Fondrk MK. The effect of genotype on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 1998;182:489–500.
- Pankiw T, Page RE. The effect of genotype, age, sex, and caste on response thresholds to sucrose and foraging behavior of honey bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol A* 1999;185:207–13.
- Pankiw T, Waddington KD, Page RE. Modulation of sucrose response thresholds in honey bees (*Apis mellifera* L.): influence of genotype, feeding, and foraging experience. *J Comp Physiol A* 2001;187:293–301.
- Rauh JJ, Lummis SC, Sattelle DB. Pharmacological and biochemical properties of insect GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1990;8:325–9.
- Raymond V, Sattelle DB, Lapied B. Co-existence in DUM neurones of two GluCl channels that differ in their picrotoxin sensitivity. *NeuroReport* 2000;11:2695–701.

- R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, 2004, <http://www.R-project.org>.
- Sattelle DB. GABA receptors of insects. *Adv Insect Physiol* 1990; 22:1–113.
- Scheiner R, Page RE, Erber J. Sucrose responsiveness and behavioral plasticity in honey bees (*Apis mellifera*). *Apidology* 2004;35:133–42.
- Si A, Helliwell P, Maleszka R. Effects of NMDA receptor antagonists on olfactory learning and memory in the honeybee (*Apis mellifera*). *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:191–7.
- Stopfer M, Bhagavan S, Smith BH, Laurent G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 1997;390:70–4.
- Tingle CC, Rother JA, Dewhust CF, Lauer S, King WJ. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol* 2003;176:1–66.
- Usherwood PN, Grundfest H. Peripheral inhibition in skeletal muscle of insects. *J Neurophysiol* 1965;28:497–518.
- Wildman M, Ott SR, Burrows M. GABA-like immunoreactivity in nonspiking interneurons of the locust metathoracic ganglion. *J Exp Biol* 2002;205:3651–9.
- Witten JL, Truman JW. Distribution of GABA-like immunoreactive neurons in insects suggests lineage homology. *J Comp Neurol* 1998;398:515–28.
- Yamamoto T, Nagai T, Shimura T, Yasoshima Y. Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn J Pharmacol* 1998;76:325–48.
- Zhao X, Yeh JZ, Salgado VL, Narahashi T. Fipronil is a potent open channel blocker of glutamate-activated chloride channels in cockroach neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:192–201.

ANNEXE 2 : CV

L'annexe 2 comporte un CV détaillé et rapporte également les colloques auxquels j'ai participé, les formations que j'ai suivies et les cours que j'ai donnés.

Matthieu DACHER

Centre de Recherches sur la Cognition Animale, UMR CNRS 5169
Université Paul Sabatier TOULOUSE III
Bât 4R3, 118 route de Narbonne
31062 TOULOUSE CEDEX 09, FRANCE
Tel: +33 (0)561 557 582
Fax: +33 (0)561 558 444
e-mail: dacher@cict.fr



Né le 27 décembre 1978
Permis de conduire B

FORMATION

- 2001-2005 : **Doctorat** au Centre de Recherches sur la Cognition Animale de l'université Toulouse III.
- 2000-2001 : **DEA Neurosciences, Comportement, Cognition** à l'université de Toulouse III ; 5^{ème} sur 17, 14,96/20, mention Bien.
- 2000-2005 : **formation doctorale** en statistiques, modélisation, programmation (180 h).
- 1999-2000 : **Maîtrise Biologie des Populations et des Écosystèmes** option Biologie du Comportement à l'université Nancy I ; 1^{er} sur 17, 14/20, mention Bien.
- 1998-1999 : **Licence Biologie des Organismes** à l'université Clermont-Ferrand II ; 8^{ème} sur 88, 13,68/20, mention Assez Bien.
- 1996-1998 : **DEUG Science de la Vie et de la Terre** option Biologie à l'université Nancy I puis à l'université Clermont-Ferrand II ; 17^{ème} sur 155, 13,12/20, mention Assez Bien.
- 1996 : **Baccalauréat Scientifique** option Biologie au Lycée Saint Sigisbert de Nancy ; 11,16/20.

TRAVAUX DE RECHERCHES

- 2000-2005 : thèse sur **la mémoire chez l'abeille** sous la direction de M. Gauthier.
- Été 2003 : **stage de 6 semaines au laboratoire de J. Erber** à la Technische Universität de Berlin (Allemagne) sur les mouvements d'antennes et la sensibilité au sucre chez l'abeille ; ce séjour a été financé par l'université Toulouse III et l'Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques.
- Été 1999 : **stage de 6 semaines au laboratoire de Neuroendocrinologie du Vieillessement** de l'université Clermont-Ferrand II sur le comportement alimentaire du rat sous morphine, sous la direction de J. Alliot ; un **article** a été publié.

AUTRES COMPETENCES

- **Langages** : Français (langue maternelle), Anglais courant (Certificate in Advanced English de Cambridge, 1999), Espagnol (lecture).
- **Informatique** : bureautique, logiciels de mathématique et statistiques (SPSS, R, Scilab, Maple), programmation (C⁺⁺).
- **296 heures d'enseignements**, en mathématiques et statistiques (208h) et en méthodologie expérimentale et neurobiologie (88h) ; encadrements de plusieurs stagiaires au sein du laboratoire.

Communications scientifiques

- Deux **communications orales** lors des réunions du Club de Neurobiologie de l'Invertébré les 12 et 13 mai 2003 à Caen et les 27 et 28 mai 2004 à Montpellier.
- Diverses **présentations orales** au sein du Centre de Recherches sur la Cognition Animale (séminaires, présentation d'article) et lors d'évènements locaux (colloque alpha-T, réunions d'IFR) ; représentant du Centre au forum des laboratoires en sciences cognitives à Paris (15 avril 2005).
- Quatre **posters** dans des **colloques nationaux** (colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal à Caen du 17 au 19 mars 2004, participation grâce à une bourse de la société ; et colloque de la Société des Neurosciences Française à Lille du 18 au 20 mai 2005) et **internationaux** (colloque de la Société des Neurosciences Allemande à Göttingen du 12 au 15 juin 2003, participation à ce colloque grâce à une bourse de l'Association des Membres de l'Ordre des Palmes Académiques ; et colloque de l'International Society for Neuroethology à Nyborg au Danemark, du 8 au 13 août 2004).

Formation doctorale

- **Apprentissage de la programmation** : module de 80 heures de cours, TD et TP d'apprentissage de la programmation (avec les langages C et C++) suivi en 2001 et organisé par l'UFR MIG de l'université Paul Sabatier.
- **Ateliers de statistique avancée** : 11 ateliers organisés par l'école doctorale **CLESCO**, soit au total 30h30 de formation suivies en 2002 et 2003 (Méthodologie en statistiques multivariées : 3h, Louis Ferré ; Classifications et analyses discriminantes : 2h, Sabine Mercier ; L'échantillonnage : 2h, Nathalie Villa ; Analyse de contenus textuels : 2h30, Annette Burguet ; Les problèmes de limites en statistiques : 3h, Joseph Saint-Pierre ; Les graphes : 3h, Bertrand Jouve ; Modèle d'équation structurelle : 4 fois 3h, Stéphane Vautier et Saïd Jmel ; Réseaux de neurones et statistiques : 3h, Louis Ferré).
- **Ateliers de formation professionnelle** : 3 ateliers organisés par l'école doctorale **CLESCO**, soit au total 10h de formation suivies en 2002 et 2004 (La relation formation-emploi : 3h, par Michel Fournet ; Budgets de recherche : 3h, Annie Soulié et Jean Marie Cellier ; Le projet professionnel : moteur pour l'emploi : 4h, Virginie Dayde).

- **Introduction Avancée à la Modélisation pour la Biologie** : école d'une semaine organisée par l'École Normale Supérieure de Lyon du 3 au 7 mai 2004 (participation grâce au soutien de l'École Normale Supérieure de Lyon).
- **Formation aux techniques d'histologie et de cytologie** : atelier de 15h du 27 au 29 septembre 2004 animé à Toulouse par Alain et Colette Strambi.
- **Ateliers CNRS de statistiques** : deux ateliers CNRS de deux jours et demi chacun organisés à Clermont-Ferrand du 19 au 25 juin 2005 (L'utilisation de contrastes dans l'ANOVA et L'analyse des trajets et les équations structurales).

Activités d'enseignements

- **Outils mathématiques** (144h à des étudiants en 2^{ème} année de sciences de la vie), de 2002 à 2004 : 2 fois 18 heures de TD (analyse, équation différentielles, matrices, probabilités), 6 fois 18 heures de TP sur ordinateur (applications des TD avec les logiciels Maple et R).
- **Statistiques appliquées** (32h à des étudiants en 2^{ème} année de sciences de la vie), 2003-2004 : 16 heures de TD (statistiques descriptives, tests d'hypothèses), 2 fois 8 heures de TP sur ordinateur (applications des TD avec le logiciel R).
- **Méthodologie expérimentale** (66h à des étudiants en 1^{ère} année de sciences de la vie), 2002-2003 : 11 fois 6 heures de TD (règles de conception d'une expérience scientifique).
- **Neuroanatomie** (12h à des étudiants en 1^{ère} année de sciences de la vie), 2003 : 3 fois 4 heures de TP (étude du système nerveux humain, dissection de l'encéphale du cochon).
- **Statistiques et modélisation** (32h à des étudiants en maîtrise de neurosciences), 2002-2003 : 2 fois 16 heures de TP (programmation, équations différentielles, matrices, systèmes complexes, modélisation et statistiques avec les logiciels Scilab et R).
- TD de neurosciences comportementales : **Reconnaissance mère-jeune** (10h à des étudiants en 3^{ème} année de psychologie, service d'enseignement à distance), 2005 : 5 fois 2 heures de TD.
- Encadrement de plusieurs **stagiaires** dans l'équipe.

