



HAL
open science

Concomitants neurochimiques d'un conditionnement de type I chez l'abeille

Valérie Cano, Asma Zaoujal, Monique Gauthier, Luc P. Belzunces, Daniel Richard

► **To cite this version:**

Valérie Cano, Asma Zaoujal, Monique Gauthier, Luc P. Belzunces, Daniel Richard. Concomitants neurochimiques d'un conditionnement de type I chez l'abeille. Bulletin SFECA - Société Française pour l'Etude du Comportement Animal, 1993. hal-04652008

HAL Id: hal-04652008

<https://hal.science/hal-04652008>

Submitted on 17 Jul 2024

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.

CONCOMITANTS NEUROCHIMIQUES D'UN CONDITIONNEMENT DE TYPE I CHEZ L'ABEILLE

V. CANO LOZANO¹, A. ZAOUJAL¹, M. GAUTHIER¹,
L. BELZUNCES² & D. RICHARD¹

*¹ Laboratoire de Neurobiologie de l'Insecte, Centre de Recherche en Biologie du
Comportement, URA-CNRS 664, Université Paul Sabatier, 118 Route de
Narbonne, 31062 Toulouse-Cédex, France*

*² INRA, Domaine de Saint Paul, Station de Phytopharmacie, B.P. 91, 84143
Montfavet-Cédex, France*

Quoique dotée d'un système nerveux relativement simple, une abeille en contention apprend très rapidement à reconnaître une odeur associée à une source alimentaire (Takeda, 1961, Bitterman et col., 1983).

L'extension du proboscis, déclenchée de façon réflexe par l'application d'une solution sucrée sur l'antenne ou les tarsi (stimulus inconditionnel), peut être obtenue par présentation d'une odeur (stimulus conditionnel), initialement non signifiante, après association de ce stimulus conditionnel et du stimulus inconditionnel.

Parmi les différentes méthodes utilisées pour comprendre les mécanismes nerveux de cet apprentissage, la neurochimie et la neuropharmacologie se sont penchées sur le rôle des neurotransmetteurs dans le conditionnement. Les amines biogènes ont fait l'objet de nombreux travaux concernant leur intervention dans les processus de mémorisation (Mercer et Menzel, 1982; MacMillan et Mercer, 1987; Michelsen, 1988).

Cependant, le rôle de l'acétylcholine n'a pas été appréhendé, bien que celle-ci soit présente en grande quantité dans le cerveau des invertébrés (Breer, 1987). Des études histochimiques ont démontré la présence d'acétylcholinestérase dans le système nerveux et sa localisation a été précisée. L'utilisation d'a-bungarotoxine marquée a permis la localisation des récepteurs nicotiques dans le cerveau d'abeille, notamment au niveau des corps en champignons (Kreissl et Bicker, 1989). La présence de ces récepteurs a été confirmée par une étude pharmacologique. Cette approche a également montré l'existence de récepteurs muscariniques mais ceux-ci sont moins nombreux que les récepteurs nicotiques (Huang et Knowles, 1990) et leur localisation n'a pas été définie. Tous ces résultats semblent indiquer une participation du système cholinergique dans les fonctions cérébrales.

Nous nous sommes intéressés à son implication dans les processus de mémorisation. Des mesures d'activité de l'acétylcholinestérase, enzyme de dégradation de l'acétylcholine, ont été prises en relation avec le conditionnement (Gauthier et col., 1992). L'effet du blocage des récepteurs cholinergiques muscariniques a été recherché sur l'apprentissage et les différentes étapes de la mémorisation.

MATERIEL ET METHODE

Les abeilles sont prélevées à l'entrée de la ruche. Les individus sont maintenus en contention dans de petits cylindres à l'aide d'un mélange cire-collophane, la tête et les pattes antérieures restent libres. Aucune anesthésie n'est pratiquée. Les abeilles sont soumises à un jeûne pendant une période de deux heures avant le début des expérimentations.

1. Conditionnement

La procédure de conditionnement est analogue à celle utilisée par Mercer et Menzel (1982).

La source odorante est délivrée avec une seringue contenant du papier imbibé de 10 ml d'extrait de vanille. La stimulation odorante (stimulus conditionnel: SC) est appliquée durant 6 s au niveau d'une antenne. Trois secondes après le début de la stimulation, une goutte de solution de saccharose à 40 % est mise en contact avec la même antenne pendant 3 secondes (stimulus inconditionnel=SI). L'extension du proboscis est récompensée par de l'eau sucrée que l'abeille peut prélever pendant 3 s après la fin de la stimulation odorante. Sont éliminés tous les individus qui ne présentent pas une extension du proboscis lorsque le SI est présenté au niveau des antennes et ceux qui répondent à l'odeur avant le conditionnement.

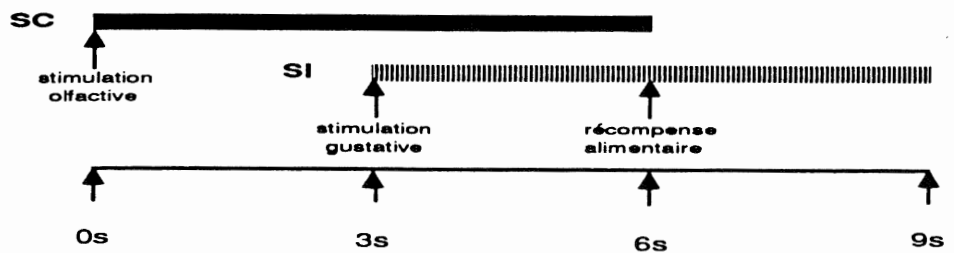


Figure 1: procédure de conditionnement.

2. Mesure de l'activité de l'acétylcholinestérase

Les abeilles sont conditionnées en cinq essais séparés par un intervalle de cinq minutes. Les animaux ayant répondu par une réponse conditionnée lors des deux derniers essais au moins de la séance d'apprentissage constituent le groupe GL (abeilles conditionnées avec succès). Les animaux n'ayant pas atteint ce critère constituent le groupe BL (conditionnés sans succès). Dans le groupe contrôle, les stimulations olfactives et gustatives ne sont pas appariées et sont séparées par un intervalle de 5 minutes.

Une fois le conditionnement effectué, la moitié des abeilles de chaque groupe est sacrifiée et leur cerveau est prélevé et congelé (-80°C). L'autre moitié est gardée pendant une semaine dans une cage avec de l'eau et de la nourriture puis les abeilles sont sacrifiées et leurs cerveaux prélevés.

L'activité de l'acétylcholinestérase est alors mesurée dans chaque lot.

3. Injection de la scopolamine

Un essai unique de conditionnement, réalisé selon la procédure décrite dans la figure 1 est utilisé dans ces expériences. Lors de l'épreuve de rétention, le stimulus conditionnel seul est présenté. Le pourcentage d'animaux répondant par une extension du proboscis à l'odeur est calculé.

La scopolamine (scopolamine hydrochloride, SIGMA) est préparée dans une solution Ringer contenant 0,2 g de KCl, 0,2 g de CaCl₂, 4,0 g de sucrose, 9,0 g de NaCl dans un litre d'eau distillée (Mercer et Menzel, 1982). La concentration de la solution est de 0,5 mg/kg d'abeilles. La solution Ringer servira aussi pour les groupes témoins.

Une dissection est faite au niveau de l'ocelle médian: la lentille ainsi que la partie de cuticule qui l'entoure sont enlevées, jusqu'à l'obtention d'une ouverture permettant le passage de l'aiguille d'une microseringue Hamilton (N 7102). Les abeilles disséquées sont isolées pendant 30 minutes, la surface de cerveau exposé étant protégée par un morceau de coton imbibé de liquide physiologique. 0,25 ml de solution sont injectés pendant une période de 1 minute environ.

Effet de la scopolamine sur le réflexe d'extension du proboscis

L'expérience porte sur 2 lots de 30 individus, un lot recevant du Ringer et un lot recevant de la scopolamine. Trente minutes après la dissection, chaque abeille est testée avec le stimulus inconditionnel, seules celles qui répondent par une extension du proboscis sont conservées.

Les abeilles sont testées avec le stimulus inconditionnel 1 minute et 10 minutes après l'injection.

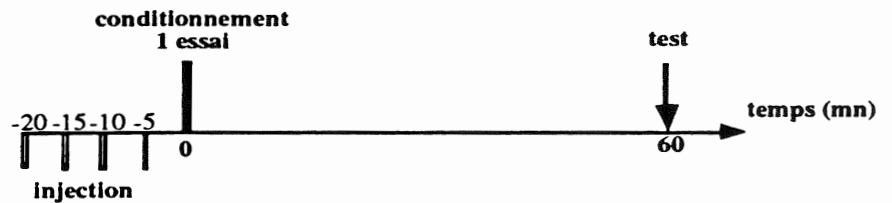
Injection avant le conditionnement

Les abeilles sont réparties en 8 lots de 47 individus, 4 lots recevant du Ringer et 4 lots recevant de la scopolamine. Les abeilles sont conditionnées à l'aide d'un seul essai 20 mn, 15 mn, 10 mn ou 5 mn après l'injection (fig 2a). La réponse conditionnée est testée 60 mn après le conditionnement.

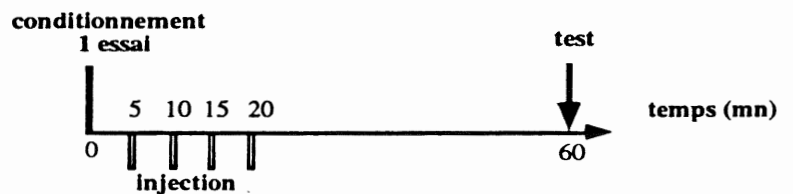
Injection après le conditionnement

Les abeilles sont réparties en 8 lots de 32 individus. Les abeilles sont conditionnées à l'aide d'un seul essai. Cinq, dix, quinze ou vingt minutes après le conditionnement, l'injection de scopolamine ou de Ringer est effectuée (fig 2b). La réponse conditionnée est testée 60 mn après le conditionnement.

a: injection avant le conditionnement



b: injection lors des 20 minutes qui suivent le conditionnement



c: injection 20 minutes après le conditionnement

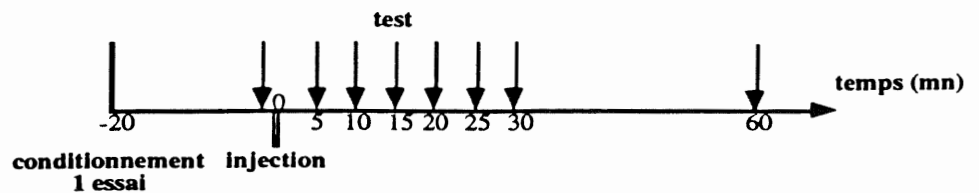


Figure 2: Différents protocoles d'injection de la scopolamine

Injection 20 minutes après le conditionnement

Les abeilles sont réparties en 14 lots de 35 individus, 7 lot recevant du Ringer et 7 lots recevant de la scopolamine. Les abeilles sont conditionnées à l'aide d'un seul essai. L'injection est réalisée 20 mn après le conditionnement. Le pourcentage de réponses conditionnées est mesuré immédiatement avant l'injection. Le taux de réponses conditionnées est mesuré 5, 10, 15, 20, 25, 30 ou 60 mn après l'injection (fig 2c).

RESULTATS

1. Activité de l'acétylcholinestérase

L'apprentissage induit à court terme une diminution de l'activité de l'acétylcholinestérase chez les animaux conditionnés avec succès (Figure 3). Cette modification est amplifiée au bout d'une semaine. On observe également une baisse de l'activité au bout d'une semaine chez les animaux qui ont été conditionnés sans succès. La mémorisation accentue la chute de l'activité enzymatique. On n'observe pas de de modification de l'activité enzymatique dans le groupe contrôle.

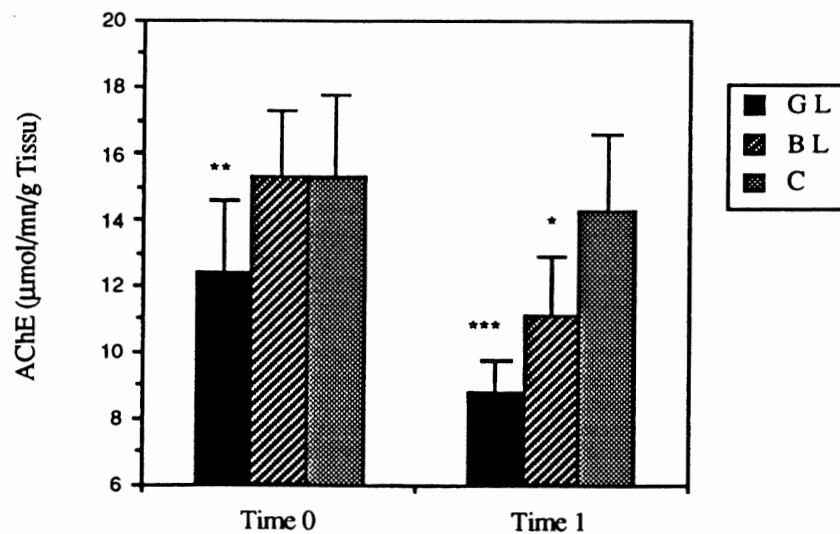


Figure 3: Activité de l'AChE mesurée immédiatement (Time 0) ou une semaine (Time 1) après le conditionnement chez des animaux ayant été conditionnés avec succès (GL), sans succès (BL) et chez les contrôles.

* $p < 0,003$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0001$.

2. Effet de la scopolamine

Effet de la scopolamine sur le réflexe d'extension du proboscis

La réponse inconditionnelle d'extension du proboscis consécutive à la stimulation gustative de l'antenne, a été testée avant et après injection de Ringer ou de scopolamine. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus sur des animaux témoins, montre que le réflexe d'extension du proboscis n'est pas affecté par l'injection de scopolamine. En effet, le taux des réponses inconditionnelles n'est pas modifié par rapport à celui obtenu avant l'injection de la drogue.

Effet de la scopolamine injectée avant le conditionnement

Dans une seconde étape, l'injection de scopolamine a été pratiquée de 5 à 20 minutes avant le conditionnement. Les animaux sont ensuite testés 1 heure après l'essai de conditionnement.

Aucun effet significatif de la scopolamine n'a pu être détecté sur la rétention à long terme de l'apprentissage, quel que soit le délai respecté entre l'injection du produit et le conditionnement (fig 4).

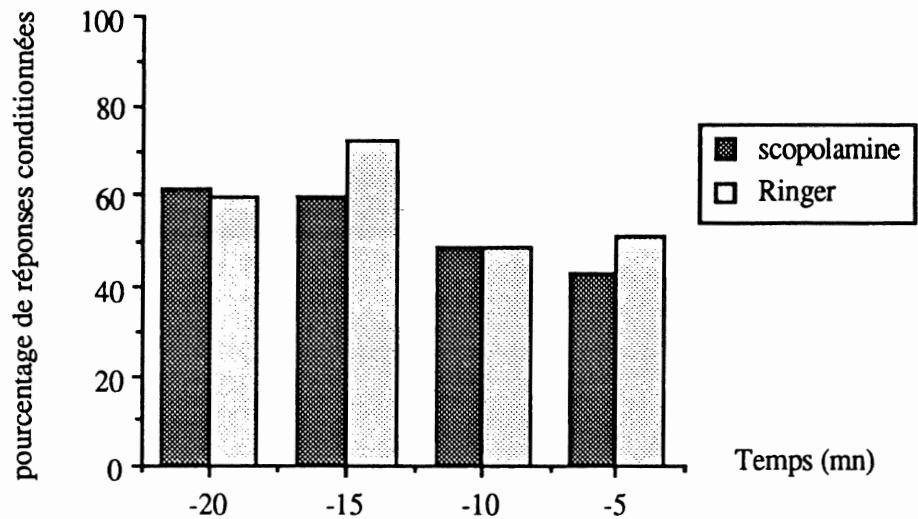


Figure 4: Injection avant le conditionnement. Une injection de Ringer (clair) ou de scopolamine (foncé) est réalisée 20, 15, 10 ou 5 minutes avant le conditionnement et les abeilles sont testées 1 h après.

Il faut cependant noter une légère baisse du taux de réponses conditionnées lorsque le moment de l'injection est proche de celui du conditionnement. Ceci est probablement dû au traumatisme causé par l'injection elle-même, puisque ce phénomène peut être observé aussi bien à la suite d'une injection de scopolamine que de Ringer.

Effet de la scopolamine injectée après le conditionnement

Un dernier ensemble d'expériences a été réalisé en pratiquant une injection de scopolamine au cours des 20 minutes qui suivent la séance de conditionnement. Deux situations expérimentales ont alors été distinguées.

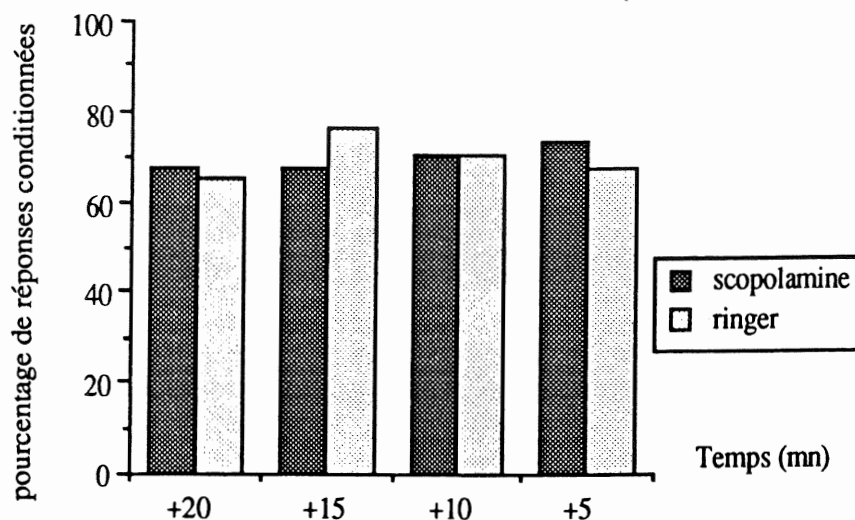


Figure 5: Injection après le conditionnement. Une injection de Ringer (clair) ou de scopolamine (foncé) est réalisée 5, 10, 15 ou 20 minutes après le conditionnement et les abeilles sont testées 1 h après l'essai.

- Dans un premier groupe, les injections de scopolamine sont réalisées 5 à 20 mn après le conditionnement, et les abeilles testées 1 heure après l'essai. Dans cette situation expérimentale, aucune différence n'a pu être observée entre les effets de l'injection de scopolamine et celle de Ringer (fig. 5).

- Dans un second groupe, l'injection du produit est réalisée 20 mn après le conditionnement et la réponse de l'animal est testée juste avant cette injection (témoins) et 5 à 60 minutes après l'injection (fig 6 et 7). Dans ce cas, un effet net de l'injection de scopolamine peut être observé.

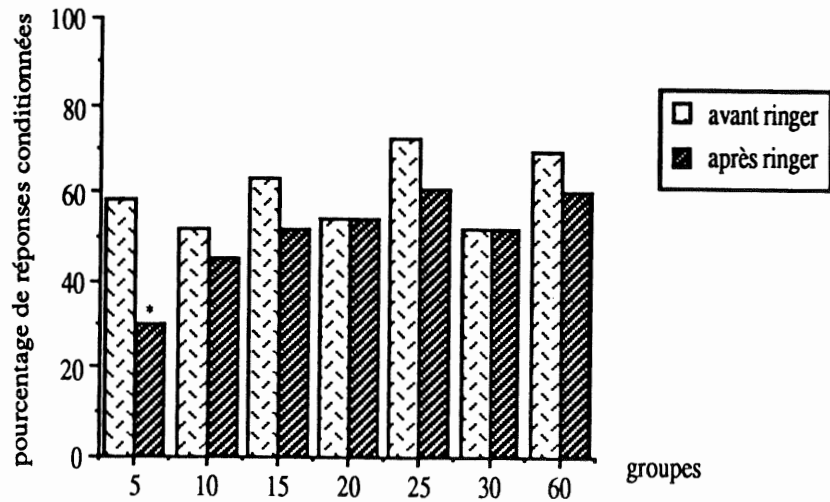


Figure 6: Effet du Ringer injecté 20 minutes après le conditionnement. Une injection de Ringer est effectuée sur 7 groupes d'abeilles 20 minutes après le conditionnement. Les réponses conditionnées sont testées 1 minute avant l'injection (clair) et 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 60 minutes après. * $p < 0,05$

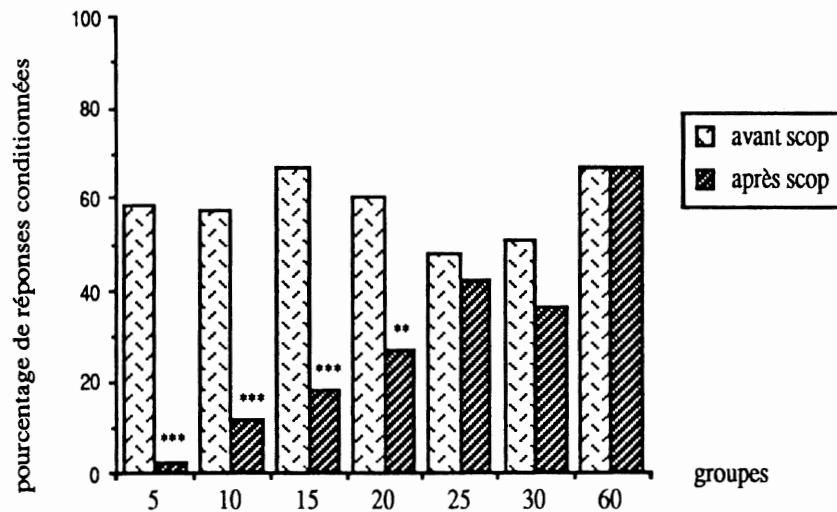


Figure 7: Effet de la scopolamine injectée 20 minutes après le conditionnement. Une injection de scopolamine est effectuée sur 7 groupes d'abeilles 20 minutes après le conditionnement. Les réponses conditionnées sont testées 1 minute avant l'injection (clair) et 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 60 minutes après. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

L'effet de la scopolamine sur le taux de réponses conditionnées varie en fonction du délai qui sépare le moment de l'injection de celui du test. Plus le délai est important, moins l'effet de la scopolamine est marqué. Une heure après l'injection, le taux de réponses conditionnées est comparable entre les lots témoins et expérimentaux. Ainsi, l'influence de la drogue sur la réponse conditionnée disparaît 25 mn après l'injection.

Il faut néanmoins noter un effet de l'injection du Ringer sur le taux de réponses mesuré 5 minutes après l'administration du produit (fig 6). Cet effet du solvant est à déduire de l'effet propre de la drogue pour le groupe testé à 5 minutes. L'injection en elle-même n'a plus d'effet sur les autres groupes au-delà de 5 minutes.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats permet de conclure que le système cholinergique intervient dans le conditionnement olfactif chez l'abeille.

L'apprentissage induit, dans de brefs délais et à plus long terme une diminution de l'activité cholinestérasique. Ces observations sont en accord avec des données plus anciennes de la littérature chez le vertébré, montrant une amélioration des capacités mnésiques par administration d'anticholinestérasiques comme la physostigmine (Deutsch et Leibowitz, 1966).

Le blocage des récepteurs muscariniques par la scopolamine réalisé en pré-essai ou immédiatement après l'apprentissage n'a pas d'effet sur la rétention à long terme. Ces résultats permettent de supposer que ces récepteurs n'interviennent pas lors de l'acquisition ou de la consolidation de l'information. L'injection de scopolamine 20 minutes après l'apprentissage, alors que la trace mnésique est stabilisée, diminue les performances en rétention, vraisemblablement par blocage des processus de rappel. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu par injection intracérébrale de dopamine (Mercer et Menzel, 1982). Bien que les interactions centrales entre les systèmes de neurotransmetteurs ne soient pas connues chez l'invertébré, une régulation de l'activité du système cholinergique par des neurones dopaminergiques pourrait être envisagée.

Un prolongement de ce travail consiste à étudier le rôle des récepteurs nicotiques dans l'apprentissage.

Les données fournies par la littérature sur le vertébré montrent la complexité des effets de la scopolamine sur la fonction mnésique (pour revue, voir Collerton, 1986).

Lorsque la scopolamine est injectée en pré ou en post-essai, les effets amnésiants dépendent de la dose utilisée, de la nature de l'épreuve comportementale, mettant en jeu la mémoire de référence ou de travail, du degré de maîtrise de la

tâche. Des effets moins spécifiques sur l'attention, l'habituation ou la sensibilisation ne sont pas exclus.

Dans ce contexte, il serait intéressant de reprendre ces expériences sur l'abeille en utilisant des épreuves comportementales plus complexes, basées sur les capacités d'orientation spatiale par exemple, afin de prendre en compte ces paramètres.

Références

- BITTERMAN M., MENZEL R., FIETZ A. and SCHÄFER S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in Honeybees (*Apis mellifera*). *J. of Comparative Psychology*, 97, 107-119.
- BREER H. (1987). Neurochemical aspects of cholinergic synapses in the insect brain. *Arthropod Brain. Its Evolution, Development, Structure and Functions* (Edited by Gupta A.P.), 202-224. Springer, Berlin.
- COLLERTON D. (1986). Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 19, 1-28.
- DEUTSCH J. A. and LEIBOWITZ S.F. (1966). Amnesia or reversal of forgetting by anticholinesterase depending simply on time of injection. *Science*, 153, 1017-1018.
- GAUTHIER M., BELZUNCES L.P., ZAOUJAL A., COLIN M. AND RICHARD D. (1992). Modulatory effect of learning and memory on honey bee brain acetylcholinesterase activity. *Comp. Bioch. Physiol.*, 103C, 91-95.
- HUANG Z. and KNOWLES C. O. (1990). Nicotinic and muscarinic receptors in honeybee (*Apis mellifera*) brain. *Comp. Biochem Physiol*, 97C, 275-281.
- KREISSL S. and BICKER G. (1989). Histochemistry of acetylcholinesterase and immunocytochemistry of an acetylcholine receptor-like antigen in the brain of the honeybee. *The Journal of Comparative Neurology*, 286, 71-84.
- MACMILLAN C. S. and MERCER (1987). An investigation of the role of dopamine in the antennal lobes of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol.*, 160, 359-356.
- MERCER A. R. and MENZEL R. (1982). The effects of biogenic amines on conditioned and unconditioned responses to olfactory stimuli in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. physiol.*, 145, 363-368.
- MICHELSSEN B. (1988). Catecholamines affect storage and retrieval of conditioned odour stimuli in honeybee. *Comp. biochem. physiol.*, 91C, 479-482.
- TAKEDA K. (1961). Classical conditioned response in the honeybee. *J. ins. physiol.*, 6, 168-179.