

Perception et apprentissage olfactifs chez l'Abeille domestique (*Apis mellifera*) : imagerie calcique dans le lobe antennaire

par Jean-Christophe Sandoz

Centre de Recherches sur la Cognition Animale, Université Paul Sabatier, 118 Route de Narbonne,
31062 Toulouse cedex 4, France. Email : sandoz@cict.fr

reçu le 5 mai 2003

RÉSUMÉ

L'Abeille domestique est un modèle important dans l'étude de l'apprentissage et de la mémoire, car elle montre des capacités d'apprentissage élevées, son cerveau est bien décrit et est accessible à un ensemble de méthodes d'enregistrements physiologiques. Nous utilisons la technique de l'imagerie calcique *in vivo* afin d'étudier la perception olfactive dans le cerveau de l'abeille, et combinons cette méthode à un conditionnement olfactif appétitif, afin de mettre en évidence les substrats neuronaux de l'apprentissage olfactif. Les odeurs sont détectées par les neurones sensoriels au niveau des antennes. Chaque neurone sensoriel se projette dans le lobe antennaire, au sein de l'une de ses 160 unités fonctionnelles, les glomérules. Là il forme des synapses avec les neurones de projection relayant l'information vers les autres centres nerveux. En imagerie calcique, chaque odeur entraîne un motif particulier d'activité dans les glo-

mérules selon un code conservé entre individus. Le lobe antennaire est aussi un des sites où la mémoire olfactive est formée. Jusqu'à présent, deux études utilisant l'imagerie calcique ont montré des modulations après apprentissage de la représentation des odeurs dans le lobe antennaire, mais avec des effets différents en fonction du type de conditionnement. Ainsi, un simple apprentissage différentiel (A+B-) entraînait une réponse calcique augmentée pour l'odeur renforcée, alors qu'un apprentissage latéralisé (A+B-/B+A-) décorrélait les motifs d'activité glomérulaire entre hémisphères cérébraux. Une telle différence pourrait être due à la formation de traces mnésiques différentes, ce qui sera étudié dans de futurs travaux. Par des marquages spécifiques des différentes populations neuronales comprises dans le lobe antennaire, nous espérons parvenir à étudier la plasticité synaptique chez l'Abeille.

SUMMARY Olfactory perception and learning in the honey bee : optical imaging in the antennal lobe

Honey bees are a key-model in the study of learning and memory, because they show considerable learning abilities, their brain is well described and is accessible to a wide range of physiological recordings and treatments. We use *in vivo* calcium imaging to study olfactory perception in the bee brain, and combine this method to appetitive olfactory conditioning to unravel the neural substrates of olfactory learning. Odours are detected by receptor neurons on the antennae. Each receptor neuron projects to the first-order neuropile of the olfactory pathway, the antennal lobe, connecting to projection neurons in one of its 160 functional units, the glomeruli. In calcium imaging experiments, each odour elicits a particular activity pattern of antennal lobe glomeruli, according to

a code conserved between individuals. The antennal lobe is also a site where the olfactory memory is formed. Using optical imaging, two studies have shown modulations of odour representation in the antennal lobe after learning, with different effects depending on the type of conditioning used. While simple differential conditioning (A+B- training) showed an increased calcium response to the reinforced odour, side-specific conditioning (A+B-/B+A- training) decorrelated the calcium responses of odours between brain sides. This difference may owe to the formation of different memories, which will be addressed in future work. By specifically staining antennal lobe neuronal subpopulations, we hope to be able in the future to study synaptic plasticity in the honey bee.



Une des questions capitales qui se pose dans l'étude des phénomènes d'apprentissage et de mémoire associatifs est comment l'information sur la qualité perceptuelle du stimulus appris et en même temps l'information concernant sa valeur prédictive d'un renforcement peut être stockée par le système nerveux. Pour répondre à une telle question, il faut avoir de bonnes méthodes d'appréciation comportementale de l'apprentissage, une très bonne connaissance du système nerveux de l'animal, et disposer de techniques physiologiques permettant d'enregistrer aussi bien l'activité de cellules uniques que de réseaux nerveux. L'abeille, *Apis mellifera* L., est un modèle bien adapté à ce type d'approche puisque (i) elle montre des capacités d'apprentissage surprenantes (Menzel & Giurfa, 2001), (ii) son système nerveux a été décrit très précisément (e.g. Mobbs, 1982) et (iii) elle s'adapte bien à toutes sortes d'enregistrements électrophysiologiques ou optophysiques (Menzel, 1999, 2001).

L'APPRENTISSAGE OLFACTIF CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE

Lors du butinage, les abeilles ouvrières apprennent à reconnaître les caractéristiques sensorielles des fleurs qu'elles visitent. En particulier, elles sont capables d'apprendre à associer l'odeur de ces fleurs avec la qualité du nectar sucré qu'elles y trouvent (Menzel, 1999). Ce type d'apprentissage associatif peut être reproduit au laboratoire chez des abeilles en contention, en conditionnant l'extension du proboscis (Bitterman *et al.*, 1983). L'extension du proboscis est une réponse réflexe déclenchée normalement par une stimulation sucrée au niveau des récepteurs gustatifs des antennes ou du proboscis. Pour conditionner la réponse d'extension du proboscis, il suffit de présenter, en association temporelle, une odeur (le stimulus conditionnel – SC – qui n'a initialement aucun effet sur la réponse) avec un renforce-

ment alimentaire sous forme de solution sucrée (le stimulus inconditionnel – SI). Chez la plupart des individus, l'odeur déclenche la réponse d'extension du proboscis après une seule présentation conjointe du SC et du SI. Cet apprentissage de type pavlovien repose sur une association odeur-nourriture qui peut durer toute la vie de l'individu et dépend d'au moins 5 phases mnésiques différentes (Menzel, 1999, 2001).

Sur le plan anatomique, la voie neuronale olfactive est bien connue (Fig. 1). Les axones des 60000 chémorécepteurs portés par chaque antenne se projettent vers les 160 glomérules, unités fonctionnelles des lobes antennaires, où ils forment des connections avec environ 4000 interneurons inhibiteurs locaux et 800 neurones de projection (Fig. 2). Les neurones de projection envoient, par le biais de trois faisceaux neuronaux, l'information vers d'autres régions du cerveau, les corps pédonculés et le lobe protocérébral latéral. La voie neuronale du SI est aussi assez bien connue : un neurone octopaminergique, le VUM-mx 1 (ventral unpaired median neuron 1 of the maxillary neuromere) a été décrit comme représentant le substrat neuronal du renforcement (Hammer, 1993). En effet, des stimulations électriques de ce neurone en association temporelle avec une stimulation odorante peuvent remplacer totalement le SI au cours du conditionnement, et produire ainsi une mémoire associative.

Le neurone VUM-mx1, *i.e.* l'information concernant le SI, converge avec la voie olfactive de chaque côté du cerveau en trois sites, le lobe antennaire, les calices des corps pédonculés et le lobe protocérébral latéral (Fig. 1). Néanmoins, des expériences de refroidissements localisés (Menzel *et al.*, 1974; Erber *et al.*, 1980) et d'injections d'octopamine associées à une stimulation odorante (Hammer & Menzel, 1998) ont montré que seuls le lobe antennaire et les corps pédonculés sont impliqués dans l'établissement de la mémoire olfactive associative. C'est ainsi, au niveau du lobe antennaire, que se fait la première convergence entre la voie nerveuse olfactive et la voie nerveuse renforçatrice. C'est à ce niveau que nous

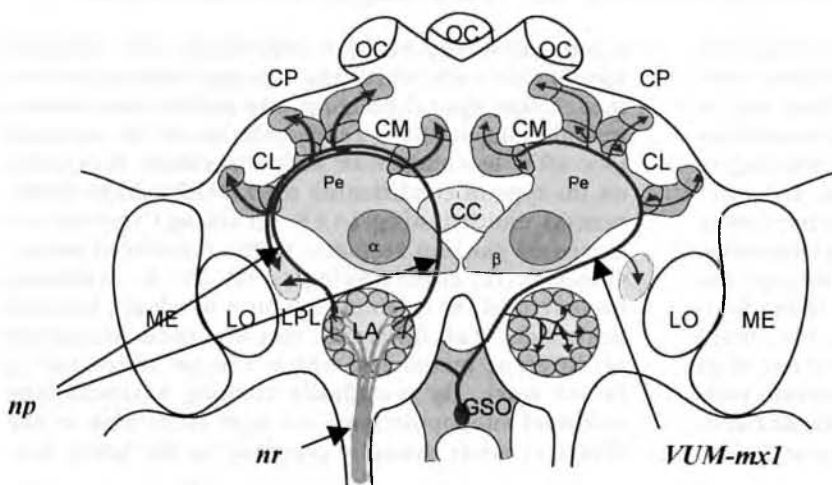


FIG. 1. – Le cerveau de l'abeille. Vue schématique des principales structures de la voie olfactive avec les connections importantes. LA : lobe antennaire, CP : corps pédonculés, LPL : lobe protocérébral latéral, CL : calice latéral, CM : calice médian, Pe : pédoncule, α : lobe α , β : lobe β . Représentés sur la gauche : les neurones récepteurs de l'antenne (*nr*, voir flèche) se projettent vers les glomérules, unités fonctionnelles des LA. Les neurones de projection (*np*, voir flèche) envoient ensuite l'information du lobe antennaire vers les corps pédonculés et le lobe protocérébral latéral de chaque côté du cerveau. Représenté sur la droite : le neurone VUM-mx1 (voir flèche) représente le SI et se projette dans chaque hémisphère au niveau du lobe antennaire, des corps pédonculés et du lobe protocérébral latéral (figure de B. Grünwald, Berlin, Allemagne, modifiée).

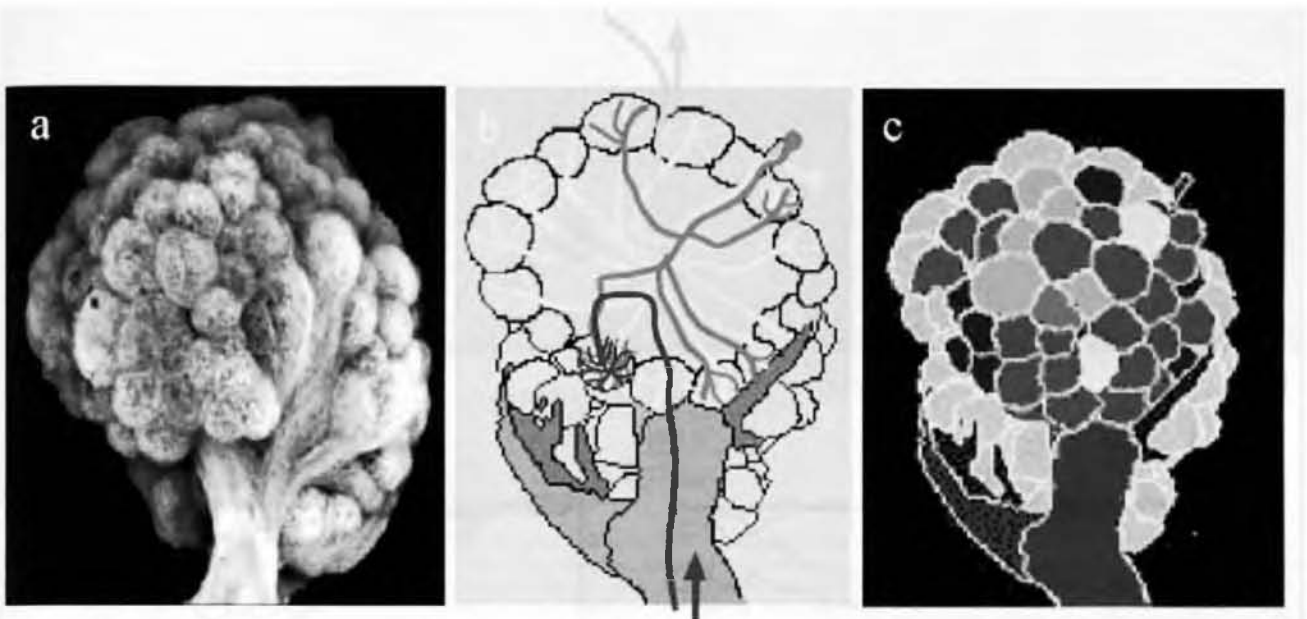


FIG. 2. – Le lobe antennaire d'Abeille : a) Marquage d'un lobe antennaire montrant le nerf olfactif au bas de l'image amenant l'information olfactive vers environ 160 structures rondes, les glomérules, unités fonctionnelles du lobe antennaire. b) Schéma de la connectivité du lobe antennaire. Les neurones récepteurs projettent vers les glomérules (noir, flèche en bas). Des réseaux de neurones locaux induisent d'importantes inhibitions latérales entre glomérules. Les neurones de projection (gris, flèche en haut) transmettent l'information traitée au sein du lobe antennaire vers d'autres centres nerveux comme les corps pédonculés et lobes protocérébraux latéraux (Cf. Fig. 1). c) Motif d'activité glomérulaire type pour une stimulation avec l'odeur 1-hexanol. Des niveaux d'activité différents sont représentés par différents niveaux de gris (figures : Sachse *et al.*, 1999, Galizia, Berlin, Allemagne, comm. pers.).

études comment l'association odeur-renforcement sucré peut être détectée et enregistrée.

IMAGERIE CALCIQUE DANS LE LOBE ANTENNAIRE

Le lobe antennaire est le lobe d'entrée de l'information olfactive dans le cerveau de l'abeille (Fig. 2), l'homologue du bulbe olfactif des vertébrés. Comme chez ces derniers, chaque glomérule reçoit l'information d'un type de récepteur olfactif, et représente ainsi une unité fonctionnelle du lobe antennaire. Grâce à la technique d'imagerie calcique, il a été possible d'enregistrer l'activité nerveuse au sein du lobe antennaire et de démontrer l'importance des glomérules dans le codage de l'information olfactive (Joerges *et al.*, 1997).

Ainsi, il a pu être montré que chaque stimulation odorante induit une activité (mesurée par une augmentation transitoire du calcium intracellulaire) dans un certain nombre de glomérules, formant une combinaison particulière pour chaque odeur (Fig. 2c, Fig. 3). Ces « motifs d'activité glomérulaire » sont conservés entre individus, et sont d'autant plus similaires entre odeurs que ces odeurs sont chimiquement proches (Galizia *et al.*, 1999a; Sachse *et al.*, 1999). Une étude antérieure s'est intéressée à de possibles modifications de ces motifs d'activité

glomérulaire après un conditionnement olfactif différentiel (Faber *et al.*, 1999). Dans ce type de conditionnement, les abeilles doivent apprendre à distinguer deux odeurs, l'une (Stimulus Conditionnel positif, SC+) est renforcée par une stimulation sucrée, l'autre (Stimulus Conditionnel négatif, SC-) est présentée en l'absence de renforcement. Les résultats ont montré que la réponse calcique globale observée pour le SC+ augmentait, alors que l'activité déclenchée par le SC- restait inchangée. Ces auteurs ont aussi indiqué que le conditionnement différentiel entraînait une décorrélation des motifs d'activité glomérulaire du SC+ et du SC-, suggérant que les motifs d'activité sont effectivement modifiés par l'apprentissage. Cependant cette étude n'avait pu identifier l'activité des glomérules au niveau individuel, et avait dû se limiter à comparer les cartes d'activité sur le lobe antennaire entier.

MODIFICATION DES SIGNAUX CALCQUES PAR L'APPRENTISSAGE OLFRACTIF LATÉRALISÉ

Le travail de Faber *et al.* (1999) a donc permis d'étudier directement le caractère spécifique de la mémoire olfactive, puisque des modifications spécifiques du traitement du SC+ et du SC- ont pu être observées dans le lobe antennaire de l'abeille. Cependant, afin d'isoler pour une même odeur les modifications liées à la valeur pré-

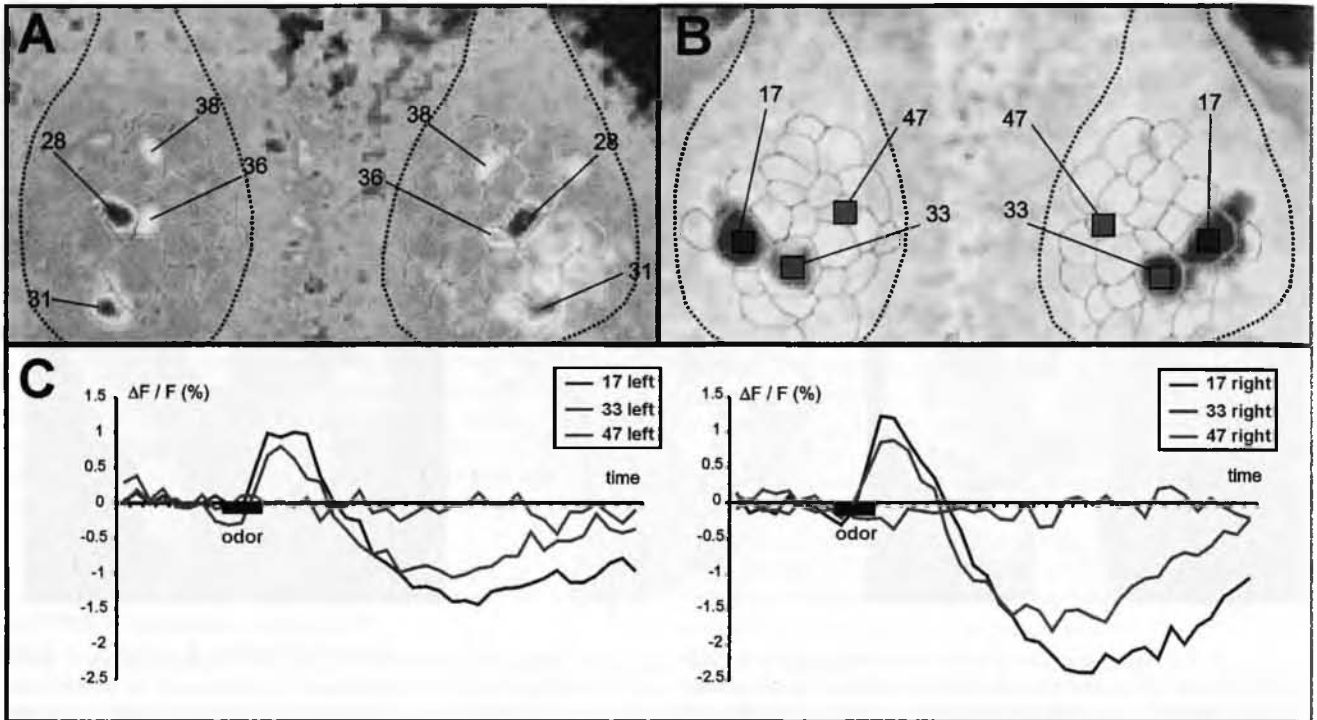


FIG. 3. – Enregistrements bilatéraux en imagerie calcique des lobes antennaires de l'abeille. A) motifs d'activité glomérulaire obtenus en réponse à l'odeur 1-hexanol. Noter l'emplacement symétrique des zones de réponse (blanc et gris). Les pointillés délimitent l'emplacement des deux lobes antennaires (nerf antennaire vers le haut). B) Motifs d'activité glomérulaire en réponse à une autre odeur, le 1-nonanol. D'autres glomérules sont actifs dans ce cas (gris). C) La cinétique des réponses calciques ($\Delta F / F$ en fonction du temps) est montrée pour trois glomérules choisis dans B, dans les lobes antennaires gauche et droit (Sandoz *et al.*, 2003).

dictive du SI, il faudrait pouvoir comparer chez le même individu les réponses physiologiques à une odeur donnée, quand celle-ci est associée au SI, et lorsqu'elle ne l'est pas. Afin de développer une telle procédure, nous nous sommes intéressés à la manière dont les deux hémisphères du cerveau de l'abeille fonctionnent (Sandoz & Menzel, 2001 ; Sandoz *et al.*, 2002). Nous avons ainsi développé une méthode de conditionnement permettant de diviser l'espace olfactif des abeilles en deux parties distinctes, grâce à des séparations plastifiées placées entre les antennes et à un dispositif de stimulation olfactif latéralisé (Fig. 4).

Grâce à ce système, nous avons pu réaliser un **conditionnement olfactif latéralisé** : nous avons ainsi montré qu'il est possible d'entraîner les abeilles à répondre de manière inverse à deux odeurs de chaque côté : dans la procédure de conditionnement **A+B- / B+A-**, une odeur A est associée au renforcement sucré lorsqu'elle est présentée à une antenne, mais explicitement non renforcée lorsqu'elle est présentée à l'antenne opposée. De manière symétrique, une seconde odeur B est renforcée lorsqu'elle est présentée du côté où l'odeur A ne l'était pas, et explicitement non-renforcée du côté opposé. Les abeilles sont non seulement capables d'apprendre à résoudre une telle tâche (elle répondent à chaque odeur seulement du côté où elle était renforcée), mais montrent

encore des performances excellentes après 24h (Sandoz & Menzel, 2001). Nous avons donc eu, grâce à ce conditionnement latéralisé, le moyen de comparer pour une même odeur et chez le même individu, les substrats nerveux de l'apprentissage différentiel, puisque chaque odeur est un SC+ d'un côté du cerveau, et un SC- de l'autre côté.

Nous avons utilisé ce nouveau conditionnement olfactif en association avec la technique d'imagerie calcique du lobe antennaire (Sandoz *et al.*, 2003). Nous avons ainsi développé une préparation du cerveau d'abeille qui permet d'enregistrer les signaux calciques des deux côtés du cerveau de manière simultanée (Fig. 3). Afin de mieux comprendre les modifications dues à l'apprentissage prenant place dans le lobe antennaire, il est important de comprendre ces effets au niveau glomérulaire dans un premier temps, et au niveau neuronal à terme. Dans cet esprit, nous nous sommes appliqués à identifier dans chaque lobe antennaire les glomérules individuels, reconnaissables grâce à leur forme, leur taille et leur position respectives (un atlas du lobe antennaire d'abeille a été publié – Galizia *et al.*, 1999b). Il a donc été possible d'extraire de ces enregistrements physiologiques l'activité de 23 glomérules et de la comparer entre côtés du cerveau. En utilisant des abeilles naïves et des abeilles soumises à un conditionnement latéralisé (A+B-/B+A-),

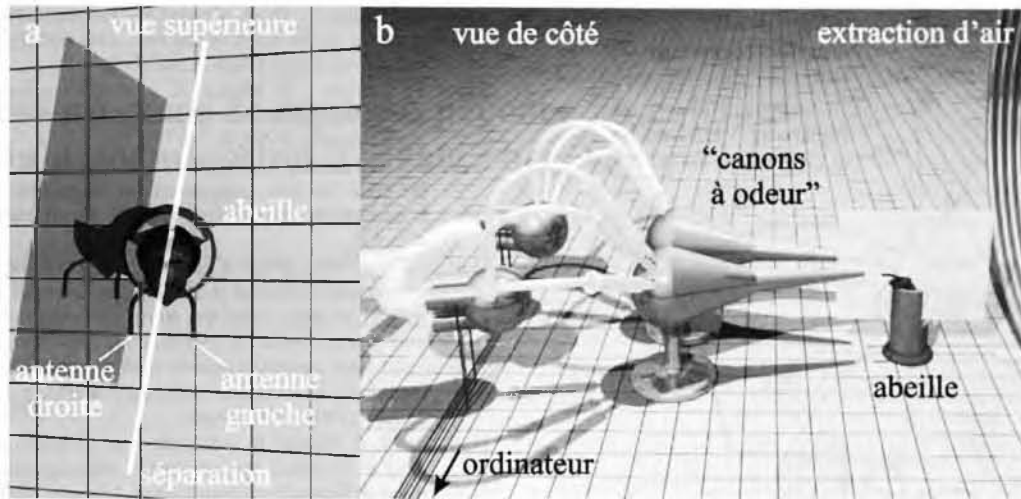


FIG. 4. – Technique développée pour stimuler les abeilles avec des odeurs différentes sur chaque antenne. a) vue supérieure d'une abeille en contention portant une séparation de plastique entre les antennes. Cette séparation est placée précisément sur la tête et tout espace entre la tête et le plastique est clos grâce à de la cire dentaire. b) abeille dans le dispositif de stimulation olfactive latéralisé : deux canons à odeurs, dont les buses sont placées de chaque côté de la séparation permettent de stimuler l'abeille avec des odeurs différentes de chaque côté, grâce à un ordinateur. L'extraction placée derrière l'abeille assure l'écoulement laminaire des flux le long de la séparation (Sandoz & Menzel, 2001, Sandoz *et al.*, 2002).

nous avons pu ainsi montrer au niveau glomérulaire que l'activité induite par une présentation odorante est strictement symétrique entre les deux lobes antennaires, et que le conditionnement latéralisé modifie la représentation nerveuse des odeurs. Ainsi, de nouveaux glomérules étaient actifs après apprentissage et la symétrie des représentations dans chacun des deux lobes antennaires était diminuée pour le SC+ et le SC-, mais pas pour les autres odeurs testées. Le conditionnement latéralisé a donc décorrélé les représentations du SC+ et du SC- entre hémisphères cérébraux. Cependant, les représentations du SC+ et du SC- étaient aussi différentes entre elles après conditionnement que chez des individus naïfs. Ceci est particulièrement intéressant, car cela suggère que le conditionnement latéralisé induit des modifications latéralisées des représentations olfactives, et ce, d'une manière différente de ce qui avait été obtenu pour un conditionnement différentiel simple (Faber *et al.*, 1999). Par exemple, le fait que nous n'ayons pas obtenu d'augmentation des signaux calciques en réponse au SC+ comme Faber *et al.* (1999) laisse penser que cette augmentation serait de courte durée, et probablement une manifestation de formes de mémoire à court terme ou à moyen terme (Menzel, 1999, 2001). A l'inverse, les formes d'apprentissage latéralisé et différentiel pourraient dépendre de mécanismes différents.

UN MODÈLE D'ÉTUDE DE LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE ?

Les résultats obtenus jusqu'à présent suggèrent que les motifs d'activité glomérulaire que nous observons

peuvent se modifier au cours de l'apprentissage, et ce, de manière différente pour un apprentissage différentiel et un apprentissage latéralisé. Cependant, les enregistrements ont été réalisés sur le lobe antennaire entier, et même si nous connaissons les réponses de glomérules individuels, il est encore difficile de connaître la participation relative des différents types de neurones du lobe antennaire. Parallèlement, un certain nombre de travaux sur les bases moléculaires de l'apprentissage olfactif ont été réalisés (pour revues, Menzel & Müller, 1996, Menzel, 1999, 2001), qui ont permis de proposer un modèle synaptique de l'apprentissage olfactif au niveau du lobe antennaire (Fig. 5). Ce modèle est basé sur une convergence des voies olfactive (stimulus conditionnel) et renforçatrice (stimulus inconditionnel) aussi bien au niveau pré- que post-synaptique, et sur des processus de facilitation synaptique associative à ces deux niveaux. De plus, des cascades moléculaires différentes seraient entraînées par des types de conditionnements différents (un ou plusieurs essais, procédures à essais espacés ou en masse).

En particulier, le calcium, PKA et NO seraient les acteurs importants de la plasticité synaptique chez l'Abeille, mais il nous manque encore un lien entre nos connaissances sur le plan cellulaire et moléculaire, et celles obtenues au niveau de l'individu entier, par exemple, dans nos expériences d'imagerie calcique *in vivo*. Faire ce lien sera un défi important pour nos recherches futures.

Remerciements. – Ce travail a été financé par la fondation Alexander von Humboldt, Human Frontier Science Programs et la fondation Fyssen. Merci à R. Menzel, M. Giurfa, G. Galizia, B. Grünwald et T. Franke.

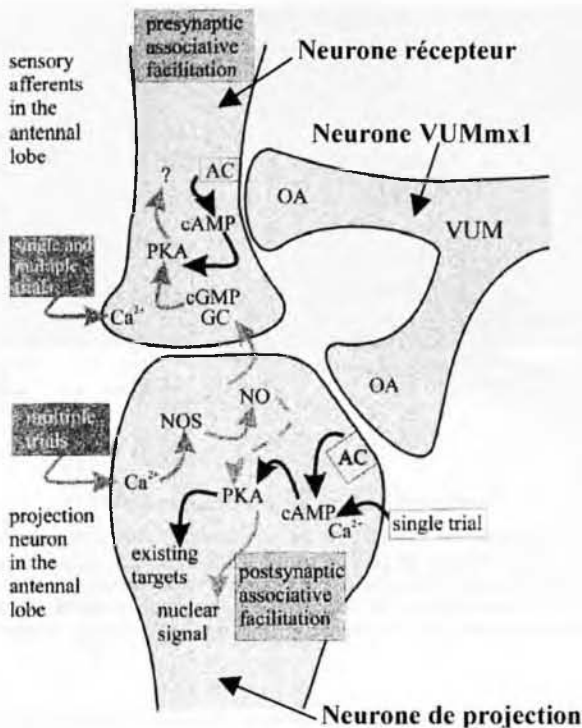


FIG. 5. – Modèle de l'apprentissage olfactif au niveau synaptique dans le lobe antennaire de l'abeille (Menzel, 1999). Ce modèle repose sur l'idée que, dans le lobe antennaire, la voie renforçatrice (stimulus inconditionnel) converge avec la voie nerveuse olfactive (stimulus conditionnel) à deux niveaux : au niveau pré- et post-synaptique de la synapse entre neurones récepteurs venant de l'antenne et neurones de projection envoyant l'information vers d'autres centres nerveux. Dans ce modèle, l'apprentissage induit une facilitation synaptique aux niveaux pré- et post-synaptiques. Dans le cas de conditionnements à essais multiples, la NO synthase serait produite dans le neurone post-synaptique et NO agirait comme messager rétrograde agissant sur la voie PKA dans le neurone présynaptique et induisant la formation de mémoire à long terme.

BIBLIOGRAPHIE

Bitterman M. E., Menzel R., Fietz A. & Schäfer S., Classical conditioning of proboscis extension in honeybees. *Journal of Comparative Psychology*, 1983, 97, 107-119.

- Erber J., Masuhr T. H. & Menzel R., Localization of short-term memory in the brain of the bee, *Apis mellifera*. *Physiological Entomology*, 1980, 5, 343-358.
- Faber T., Joerges J. & Menzel R., Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature neuroscience*, 1999, 2, 74-78.
- Galizia C. G., Sachse S., Rappert A. & Menzel R., The Glomerular code for odor representation is species specific in the honeybee *Apis mellifera*. *Nature neuroscience*, 1999a, 2, 473-478.
- Galizia C. G., McIlwrath S. L. & Menzel R., A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired using confocal microscopy. *Cell and Tissue Research*, 1999b, 295, 383-394.
- Hammer M., An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature*, 1993, 366, 59-63.
- Hammer M. & Menzel R., Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & Memory*, 1998, 5, 146-156.
- Joerges J., Küttner A., Galizia C. G. & Menzel R., Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature*, 1997, 387, 285-288.
- Menzel R., Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A*, 1999, 185, 323-340.
- Menzel R., Searching for the memory trace in a mini-brain, the honeybee. *Learning & Memory*, 2001, 8, 53-62.
- Menzel R., Erber J. & Masuhr T., Learning and memory in the honeybee. In : Browne LB, ed. *Experimental Analysis of Insect Behaviour*. Berlin : Springer Verlag : 1974, 195-217.
- Menzel R. & Giurfa M., Cognitive architecture of a mini-brain : the honeybee. *Trends in Cognitive Sciences*, 2001, 5, 62-71.
- Mobbs P. G., The brain of the honeybee *Apis mellifera* I. The connections and spatial organization of the mushroom bodies. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 1982, 298, 309-354.
- Sachse S., Rappert A. & Galizia C. G., The Spatial representation of chemical structures in the antennal lobe of honeybees : steps towards the olfactory code. *European Journal of Neuroscience*, 1999, 11, 3970-3982.
- Sandoz J. C. & Menzel R., Side-specificity of olfactory learning in the honeybee : Generalization between odors and sides. *Learning & Memory*, 2001, 8, 286-294.
- Sandoz J. C., Hammer M. & Menzel R., Side-specificity of olfactory learning in the honey bee : US input side. *Learning & Memory*, 2002, 9, 337-348.
- Sandoz J. C., Galizia C. G. & Menzel R., Side-specific olfactory conditioning leads to more specific odor representation between sides but not within sides in the honey bee antennal lobe. *Neuroscience*, 2003, in press.