



HAL
open science

Identification des réseaux neurobiologiques gouvernant les apprentissages ambigus chez l'abeille *Apis mellifera*

Constance Boitard

► **To cite this version:**

Constance Boitard. Identification des réseaux neurobiologiques gouvernant les apprentissages ambigus chez l'abeille *Apis mellifera*. Biologie animale. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30125 . tel-01378527

HAL Id: tel-01378527

<https://theses.hal.science/tel-01378527>

Submitted on 10 Oct 2016

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Présentée et soutenue le *28/09/2015* par :

CONSTANCE BOITARD

**Identification des réseaux neurobiologiques gouvernant les
apprentissages ambigus chez l'abeille *Apis mellifera*.**

JURY

JEAN-FRANÇOIS FERVEUR	Directeur de Recherches	Rapporteur
LUDOVIC DICKEL	Professeur d'Université	Rapporteur
THOMAS RIEMENSPERGER	Chargé de Recherches	Examineur
MARTIN GIURFA	Professeur d'Université	Directeur de thèse
GUILLAUME ISABEL	Maitre de Conférences	Directeur de thèse

École doctorale et spécialité :

BSB : Biologie structurale et fonctionnelle

Unité de Recherche :

Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR 5169)

Directeur(s) de Thèse :

Martin GIURFA et Guillaume ISABEL

Rapporteurs :

Jean-François FERVEUR et Ludovic DICKEL



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : *l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)*

Présentée et soutenue le *28/09/2015* par :

CONSTANCE BOITARD

**Identification des réseaux neurobiologiques gouvernant les
apprentissages ambigus chez l'abeille *Apis mellifera*.**

JURY

JEAN-FRANÇOIS FERVEUR	Directeur de Recherches	Rapporteur
LUDOVIC DICKEL	Professeur d'Université	Rapporteur
THOMAS RIEMENSPERGER	Chargé de Recherches	Examineur
MARTIN GIURFA	Professeur d'Université	Directeur de thèse
GUILLAUME ISABEL	Maitre de Conférences	Directeur de thèse

École doctorale et spécialité :

BSB : Biologie structurale et fonctionnelle

Unité de Recherche :

Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR 5169)

Directeur(s) de Thèse :

Martin GIURFA et Guillaume ISABEL

Rapporteurs :

Jean-François FERVEUR et Ludovic DICKEL

Avant-Propos

« Ce chapitre sera court, car on ne doit pas beaucoup parler de ce qu'on connaît peu. Mais quelque chose doit cependant être dit. Lorsqu'on est au courant de la façon si judicieuse dont les abeilles construisent leurs alvéoles hexagonaux, de leurs possibilités de dressage, de l'habileté avec laquelle elles envoient leurs compagnes vers le butin qu'elles ont découvert, de l'énergie avec laquelle elles évincent les faux bourdons au moment où ceux-ci ne sont plus d'aucune utilité à la colonie, on est tentés de leur reconnaître un degré appréciable d'intelligence. Pourtant, l'utilité d'un acte ne prouve pas encore qu'il ait été fait après réflexion. Nous disons que quelqu'un exécute un acte raisonnable lorsque, mettant à profit ses expériences antérieures, il fait ce qu'il faut dans une situation nouvelle, inaccoutumée. Pour cela, il faut donc pouvoir se souvenir des événements antérieurs, saisir la situation actuelle, et mettre mentalement celle-ci en rapport avec les images qu'évoque la mémoire. La première de ces conditions, une bonne mémoire, est réalisée chez les abeilles. Les expériences de dressage dont il fut question dans les chapitres précédents nous ont amplement donné l'occasion de nous en convaincre. Si on les dresse

à une couleur, c'est encore vers elle que les ouvrières voleront pour y chercher de la nourriture, après plusieurs jours pendant lesquels le mauvais temps les a empêchées de sortir ; c'est pendant des semaines, et probablement jusqu'à la fin de leur vie, qu'elles garderont le souvenir d'un parfum auquel on les a dressées, même si on le leur avait radicalement enlevé après peu de temps. On ne peut pas mettre en doute non plus le fait que les abeilles soient capables de faire certaines associations mentales [...] Nous ne pouvons cependant guère évaluer leurs aptitudes intellectuelles, vu les limites extrêmement étroites dans lesquelles elles se cantonnent [...]. Personne ne peut dire avec certitude si les abeilles ont quelque conscience de leurs agissements. Personne non plus n'a encore pu découvrir comment leurs aïeux ont acquis leurs aptitudes que chaque génération reçoit aujourd'hui, toutes prêtes, en héritage. »

Karl von Frisch, Prix Nobel de médecine (1886 - 1982)

Vie et mœurs des abeilles (p 209 - 212).

Remerciements

Ce manuscrit de thèse peut aujourd’hui être présenté grâce à l’opportunité offerte par le Centre de Recherches sur la Cognition Animale de Toulouse, mes directeurs ainsi que par le concours de l’école doctorale Biologie, Santé, Biotechnologies. Je remercie Jean-François Ferveur et Ludovic Dickel d’avoir accepté d’évaluer mon travail en qualité de rapporteurs, ainsi que Thomas Riemensperger d’avoir accepté d’être examinateur.

Je tiens particulièrement à remercier Isabelle Massou, Christine Renault, Alix Gabrielli et Maud Combe pour leur soutien technique, leur disponibilité et leur gentillesse.

Je voudrais également remercier les membres du laboratoire qui ont pu participer à mon travail, de par leur soutien ou leurs conseils. Merci aux collègues et surtout copains doctorants, Rio Tedjakumala, Claire Rusch, Aïcha Benkaoul, Amélie Cabirol, Marie Guiraud et Florencia Campetella, pour l’amitié créée, les rires, pour le soutien et leurs encouragements de tous les instants. Aux nombreux mais si attachants stagiaires passés par mon bureau, vous avez

toute mon amitié, et un grand merci également à Hélène Gauchez que j'ai eu le plaisir d'encadrer pendant son stage de première année de Master BioSanté.

D'innombrables mercis à ma famille qui m'a toujours soutenue au cours de ces huit longues années d'études. Mille baisers à mes parents qui ont toujours cru en moi, et seront très fiers de me voir enfin décerné le titre de Docteur dont je rêve depuis toute petite. A mon frère Thomas et sa compagne Valdis, à la joyeuse famille Toulet, ma reconnaissance pour tous les bons moments que nous avons partagés et partagerons encore longtemps. Et, bien entendu, ces remerciements ne seraient pas complets si je n'adressais pas toute ma gratitude et mon amour à Sylvain Toulet pour être à mes côtés, m'aider et me soutenir quelque soient les situations, me faire rire et tant m'apporter. Merci d'avoir toujours trouvé les mots justes dans les moments difficiles, calmé mon impatience, m'avoir écoutée et soutenue jour après jour. C'est à toi que je dédie cette thèse et tous mes plus beaux projets à venir.

Liste des abréviations

Ceci constitue la liste des abréviations les plus utilisées dans ce manuscrit de thèse. Les noms complets seront également donnés dans le corps du texte dès la première apparition du terme correspondant. Pour les termes en Français, en particulier anatomiques, une correspondance en Anglais est indiquée afin de faciliter la lecture de certaines figures.

5HT : sérotonine.

ACh : acétylcholine.

ALT (m, l; anciennement ACT) : tract antennaire lobe (médián, latéral; anciennement tract antenno-cérébral).

AMPC : adénosine mono-phosphate cyclique.

APL : neurone antérieur pair latéral.

ARN (si, ds) : acide ribo-nucléique (petit interférent, double brin).

CGP : acide phosphinique [(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl) ethyl] amino]-2-hydroxypropyl] (phenylmethyl) hydrochloride.

CK : cellule de Kenyon (ou KC en Anglais).

CL : corne latérale (ou LH en Anglais).

CP : corps pédonculés (ou MB en Anglais).

FN : neurone récurrent (*feedback neuron* en Anglais).

GABA : acide gamma-aminobutyrique.

GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique.

IIE : intervalle inter-essais.

IL : interneurone local.

INL : inter-neurone de la corne latérale.

LA : lobe antennaire (ou AL en Anglais).

LGIC : canal ionique (*ligand-gated ion channel* en Anglais).

MCT : mémoire à court terme (ou STM en Anglais).

MLT : mémoire à long terme (ou LTM en Anglais).

MMT : mémoire à moyen terme (ou MTM en Anglais).

NA : nerf antennaire.

NC : neurone centrifuge (ou CN en Anglais).

NP : neurone de projection (ou PN en Anglais).

NSO : neurone sensoriel olfactif.

PCT : tract protocérébro-calical.

PBS : tampon phosphate salin.

PK : protéine kinase.

PTX : picrotoxine.

RDL : sous-unité "résistance à la dieldrine".

RED : réflexe d'extension du dard (ou SER en Anglais).

REP : réflexe d'extension du proboscis (ou PER en Anglais).

RISC : complexe enzymatique (*RNA-induced silencing complex* en Anglais).

RC_A : réponse conditionnée (à A).

RCPG : récepteur couplé aux protéines G.

RI : réponse inconditionnelle.

SC : stimulus conditionnel.

SC_- : stimulus conditionnel non renforcé.

SC_+ : stimulus conditionnel renforcé.

SI : stimulus inconditionnel.

VUMmx1 : neurone maxillaire 1 ventral impaire médian.

Introduction

« La vie doit être une éducation incessante ; il faut tout apprendre, depuis parler jusqu'à mourir » écrivait Gustave Flaubert.

Faire face aux changements de leur environnement, aux inattendus, aux conditions nouvelles - souvent sources de danger - les animaux doivent en permanence être capables de percevoir et d'interpréter toutes les stimulations sensorielles qu'il perçoivent. Leur odorat, leur ouïe, leur vue, leur toucher et leur goût captent des informations essentielles qui sont alors transmises au cerveau, et qui génèrent une représentation mentale de l'environnement : de quoi s'agit-il, est-ce dangereux, est-ce connu ? Pour comparer les signaux reçus à ses propres expériences passées et adopter un comportement adéquat, l'animal doit pouvoir apprendre et mémoriser les liens de cause à effet qui unissent les différents stimuli sensoriels qu'il extrait de son monde. Le système sensoriel périphérique, à l'interface de l'organisme et de son milieu, transmet au cerveau ces signaux, qui intègre et traite ensuite les informations afin d'en conserver la trace mnésique qui sera rappelée ultérieurement lorsque l'individu

rencontrera de nouveau cette situation. Les facultés d'apprentissage sont depuis longtemps bien connues chez de nombreuses espèces animales, y compris beaucoup d'ordres d'insectes et en particulier chez l'abeille domestique *Apis mellifera*. Le mode de vie social de ce petit hyménoptère grand pollinisateur et ses comportements étonnement complexes fascinent depuis des siècles les naturalistes, qui ont cherché à décrire et comprendre ces extraordinaires capacités de communication, d'apprentissage et de mémoire. Karl von Frisch décrit pour la première fois en 1953 comment une abeille communique la localisation d'une source de nourriture aux autres butineuses, au travers d'une danse caractéristique qui « porte les abeilles voisines au comble de l'émoi [...] la danse dans la ruche annonce la découverte d'une riche récolte ». Passée cette ère où les naturalistes décrivaient leurs observations sans entrer dans la « boîte noire » qu'est le cerveau afin d'en expliquer les principes biologiques et l'organisation anatomique corrélée aux comportements, l'abeille apparaît dès les années 1940 comme un bon modèle d'étude de l'apprentissage associatif de type Pavlovien, où l'on apprend à l'animal à associer un stimulus sensoriel à sa conséquence prédictive porteuse d'une signification biologique, telle qu'une récompense alimentaire ou un renforcement nociceptif. Frings met au point en 1944 le conditionnement du réflexe d'extension du proboscis (ou encore REP) à l'odeur de coumarine, puis à des lumières colorées par Kuwabara en 1957. Takeda est le premier à mettre au point un protocole rigoureux de conditionnement du REP à des odeurs pures de synthèse [1], qui est repris et amélioré par la suite par

Bitterman quelques années plus tard [2]. Ces prémices ont permis l'essor d'une riche série de travaux employant l'abeille comme un modèle clé d'étude pour la compréhension de l'apprentissage et de la mémoire chez l'insecte. Ces travaux ont progressivement amené le monde scientifique à réévaluer la place attribuée aux différentes espèces animales au sein d'une prétendue hiérarchisation des capacités cognitives, auparavant monopolisée par quelques vertébrés, singes, chiens, oiseaux et cétacés, dont seul le cerveau complexe et développé était considéré comme digne de produire des comportements et des habilités aussi développés et admirables.

C'est au sein de cette riche histoire des études portant sur les facultés d'apprentissage chez l'abeille que j'ai souhaité inscrire mon travail de thèse. Effectué au Centre de Recherches sur la Cognition Animale d'octobre 2012 à octobre 2015 sous la direction de Martin Giurfa et Guillaume Isabel, ce travail se propose d'identifier quelles sont les structures cérébrales chez l'abeille qui sont spécifiquement requises lors des formes complexes et ambiguës d'apprentissage associatif, c'est-à-dire relevant de centres nerveux associatifs de haut rang et nécessitant des capacités cognitives d'ordre supérieur à de simples associations linéaires entre événements.

Au cours de ces trois années de thèse, nous avons combiné des approches comportementales à des techniques pharmacologiques invasives permettant de décrypter les mécanismes biologiques à l'œuvre dans le cerveau lors de l'acqui-

sition d'une tâche mentale complexe.

Ce travail a permis de mettre en lumière le rôle primordial joué par une population particulière de neurones récurrents inhibiteurs au sein d'une aire cérébrale appelée corps pédonculés, dans ces formes élaborées d'apprentissage, et ouvre un tout nouveau volet d'études à explorer dans ce domaine.

Certes, je ne crois pas que les abeilles se livrent à ces calculs compliqués, mais je ne crois pas davantage que le hasard ou la seule force des choses produise ces résultats étonnants.

– Maurice Maeterlinck, *La vie des abeilles*, 1901.

Table des matières

1	Contexte Scientifique	1
1.1	Le modèle, l'abeille <i>Apis mellifera</i> .	3
1.1.1	Généralités et biologie de l'abeille.	3
1.1.2	Capacités d'apprentissage et de mémoire.	5
1.1.3	Apprentissage et mémoire de l'abeille au laboratoire.	9
1.1.4	Les formes élaborées d'apprentissage.	15
1.2	La transmission du signal olfactif.	21
1.2.1	Les neurones sensoriels olfactifs des antennes.	23
1.2.2	Les lobes antennaires.	23
1.2.3	La corne latérale.	25
1.2.4	Les corps pédonculés.	25
1.2.5	La neurotransmission du signal olfactif.	28
1.3	La transmission du signal gustatif.	28
1.3.1	Les voies anatomiques du signal gustatif.	28
1.3.2	La neurotransmission du signal gustatif.	30
1.4	La transmission du signal nociceptif.	31

1.5	Les neurones récurrents des corps pédonculés.	33
1.5.1	Anatomie et organisation des neurones récurrents.	33
1.5.2	Fonctionnalité et caractéristiques physiologiques.	37
1.6	Le GABA et ses récepteurs.	38
1.6.1	Les récepteurs au GABA chez le vertébré.	43
1.6.2	Les récepteurs au GABA chez l'insecte.	43
1.7	Les objectifs de la thèse.	49
2	Matériel et Méthodes	51
2.1	Manipulation des abeilles.	51
2.2	Injections pharmacologiques.	53
2.2.1	Choix des antagonistes du GABA	53
2.2.2	Préparation et établissement des doses.	54
2.2.3	Matériel opératoire et injections.	59
2.3	Expériences comportementales.	61
2.3.1	Préparation des odeurs.	61
2.3.2	Protocoles de conditionnement appétitif.	62
2.3.3	Protocole de conditionnement aversif.	72
2.4	Analyse statistique des données et rédaction.	78
3	Apprentissage de l'Inversion de Consigne	81
3.1	Rôle général des corps pédonculés dans l'apprentissage de l'in- version de consigne.	83

3.2	Rôle des récepteurs ionotropiques au GABA des calices dans l'inversion de consigne.	90
3.2.1	Injection de PTX dans les calices au cours d'une inversion de consigne.	90
3.2.2	Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage simple.	97
3.2.3	La parcimonie dans les résolutions du problème.	100
3.2.4	Injection de PTX dans les calices avant une extinction de mémoire.	103
3.3	Rôle des récepteurs métabotropiques au GABA dans l'inversion de consigne.	107
3.4	Le signal GABAergique est requis au niveau des calices des corps pédonculés.	111
3.4.1	Injection de PTX dans les lobes au cours d'une inversion de consigne.	113
3.4.2	Injection contrôle de PTX dans les lobes au cours d'un apprentissage simple.	116
4	Apprentissage du <i>Feature</i> Négatif	121
4.1	Rôle des récepteurs au GABA dans l'apprentissage appétitif du <i>feature</i> négatif.	124
4.1.1	Injection de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage appétitif du <i>feature</i> négatif.	124

4.1.2	Injection de PTX dans les calices avant un apprentissage appétitif rallongé du <i>feature</i> négatif.	128
4.1.3	Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage simple.	132
4.1.4	La parcimonie dans les résolutions du problème appétitif de <i>feature</i> négatif.	135
4.2	Le signal GABAergique est requis au niveau des calices des corps pédonculés.	138
4.2.1	Injection de PTX dans les lobes au cours d'un appren- tissage appétitif du <i>feature</i> négatif.	138
4.2.2	Injection contrôle de PTX dans les lobes au cours d'un apprentissage simple.	141
4.3	Rôle des récepteurs au GABA dans l'apprentissage aversif du <i>feature</i> négatif.	145
4.3.1	Mise en évidence principes de l'apprentissage ambigu aver- sif.	145
4.3.2	Injection de PTX dans les calices au cours d'un appren- tissage aversif de <i>feature</i> négatif.	152
4.3.3	Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage aversif simple.	155
4.3.4	La parcimonie dans les résolutions du problème aversif de <i>feature</i> négatif.	156

5	Discussion Générale	161
5.1	Exploration des capacités cognitives chez l'abeille.	161
5.2	Les stratégies mises en jeu dans la résolution d'ambiguïtés. . . .	166
5.3	Utilisation de la pharmacologie lors de processus cognitifs de haut niveau.	181
5.4	Rôle des récepteurs au GABA dans les apprentissages ambigus.	186
5.5	Les apprentissages ambigus aversifs et appétitifs dépendent des mêmes réseaux.	188
5.6	Intérêt écologique et évolutif des capacités cognitives.	194
6	Perspectives Générales	199
6.1	Exploration des caractéristiques pharmacologiques du signal GA- BAergique.	200
6.2	Remplacer la méthode pharmacologique par la technique d'in- terférence ARN.	202
6.3	Quelle relation entre la latéralisation et les apprentissages com- plexes?	204
6.4	Comment le niveau de similarité des odeurs influence la perfor- mance?	207
6.5	Comment accéder à l'activité des neurones?	209
7	Conclusion	213
8	Publications	215

Bibliographie	304
Table des Figures	331

Chapitre 1

Contexte Scientifique

We've always defined ourselves by the ability to overcome the impossible. And we count these moments. These moments when we dare to aim higher, to break barriers, to reach for the stars, to make the unknown known. We count these moments as our proudest achievements. But we lost all that. Or perhaps we've just forgotten that we are still pioneers. And we've barely begun. And that our greatest accomplishments cannot be behind us, because our destiny lies above us.

– Joseph A. Cooper, *Interstellar*.

1.1 Le modèle, l'abeille *Apis mellifera*.

1.1.1 Généralités et biologie de l'abeille.

L'abeille domestique mellifère *Apis mellifera* est un insecte de l'ordre des Hyménoptères, qui regroupe également d'autres espèces d'abeilles - solitaires ou sociales - les guêpes, frelons, fourmis, présentées dans la Figure 1.1 (page 4). Cet ordre comprend toutes les espèces connues d'insectes présentant un mode de vie eusocial, caractérisé notamment dans les travaux de Wilson [3] par une division des adultes en castes reproductives et partiellement non-reproductives, un chevauchement de générations, et enfin par des soins apportés aux jeunes de la part de castes spécialisées non-reproductives. Chez l'abeille, la reine produit plusieurs milliers d'œufs par jours, disposés dans les alvéoles centrales des rayons formant le couvain ouvert, également appelé non operculé, dont prennent soin les abeilles nourrices. Après l'éclosion des œufs au bout de 3 jours de développement, les ouvrières nourrissent continuellement la larve qui se développe et augmente fortement de volume. Lorsque celle-ci atteint la fin de sa période larvaire 6 jours plus tard, les nourrices scellent l'alvéole qui compose alors le couvain fermé, ou operculé, au sein duquel la larve se transforme en nymphe puis en abeille adulte qui émerge de façon autonome au bout de 12 jours. La durée de vie de la reine peut atteindre plusieurs années, tandis que celle des abeilles ouvrières est variable selon les générations ; celles naissant durant la belle période du printemps-été vivent de 45 à 60 jours, alors

que celles émergeant durant la mauvaise saison automne-hiver peuvent vivre plusieurs mois. Les œufs ayant été fécondés donnent naissance aux femelles

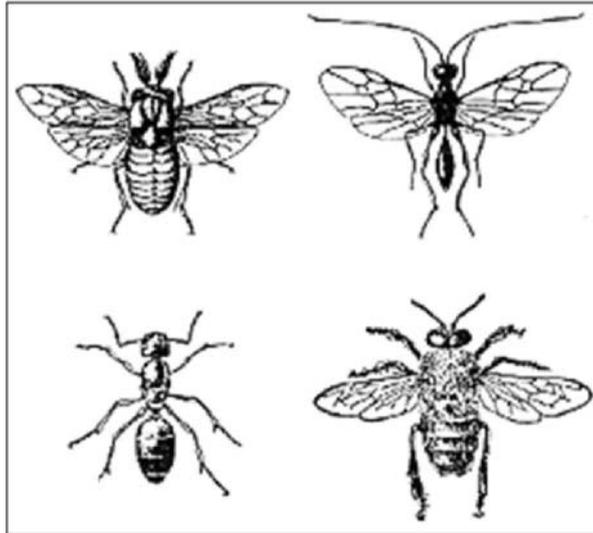


FIGURE 1.1 – Les Hyménoptères constituent un ordre d’insectes très varié. Ici, quelques espèces représentatives (de gauche à droite) : un symphyte, une guêpe, une fourmi et une abeille domestique. Modifié d’après la librairie en ligne de John R. Meyer, North Carolina State University (2009).

diploïdes, tandis que ceux non fécondés donnent naissance à des mâles reproducteurs haploïdes. Parmi les larves femelles, la majorité est destinée à faire partie de la caste ouvrière, tandis qu’une minorité génère de futures reines destinées à essaimer de nouvelles colonies. Celles-ci ont alors la particularité d’être nourries au cours du stade larvaire avec de la gelée royale, une substance produite par les nourrices qui est nécessaire à la différenciation en femelle reproductrice notamment par l’augmentation du développement et de la taille des ovaires. En dehors de la reproduction assurée par les mâles et femelles sexuées, la division des tâches chez l’abeille repose sur les différents âges des ouvrières et constitue alors un cas typique de polyéthisme d’âge. Au début de leur vie

juste après leur émergence, les jeunes ouvrières assurent les fonctions de type nettoyeuse et nourrice par l'entretien de la ruche et les soins apportés au couvain. Lorsqu'elles sont âgées de 10 à 20 jours, les abeilles s'éloignent du cœur de la ruche pour devenir des gardiennes et assurent la défense de leur colonie contre les dangers, et notamment contre la concurrence par d'autres colonies ou par les attaques de frelons. Enfin les abeilles les plus âgées, au-delà de 20 jours, quittent la ruche pour les activités de fourragement, en collectant l'eau, le nectar et le pollen des fleurs alentours nécessaires à la survie de la ruche et la constitution des réserves alimentaires essentielles pour passer la mauvaise saison hivernale [4].

1.1.2 Capacités d'apprentissage et de mémoire.

En dépit de la simplicité apparente et de la taille réduite de leur cerveau, les abeilles se révèlent capables de capacités cognitives et de comportements très élaborés, ce qui en fait d'excellents modèles, largement utilisé dans de nombreux pays depuis des années, pour les études en neurobiologie cognitive chez l'invertébré mais également pour comprendre les mécanismes moléculaires, cellulaires et neuronaux sous-jacents aux comportements communs à de nombreuses espèces animales, dont les vertébrés [5].

Le répertoire comportemental extrêmement riche de certains insectes, dont les abeilles en particulier, est intimement lié à l'évolution d'un mode de vie social au sein d'une colonie, et leurs capacités sensorielles ainsi que leurs performances

motrices sont très développées. Leur sens de l'odorat notamment est très affiné puisque les abeilles sont capables de distinguer un large panel d'odeurs parfois très semblables chimiquement [6, 7] y compris des mélanges odorants proches de ce qu'elles peuvent rencontrer dans la nature en terme de bouquets floraux. En 1953, Karl von Frisch traite dans *Vie et mœurs des abeilles* de la capacité des abeilles en libre vol à mémoriser une odeur associée à une récompense. Son expérience, certes rudimentaire mais néanmoins élégante, de dressage au parfum consistait à habituer des butineuses libres d'aller et venir à une boîte renfermant à la fois une rose émettant un parfum et un petit pot d'eau sucrée qui représente pour les abeilles une réelle récompense. Après quelques jours à les laisser venir se ravitailler, von Frisch propose alors aux abeilles plusieurs boîtes identiques et constate que les butineuses se dirigent sans hésitation vers la seule contenant la rose. Par cette expérience toute simple, il montre que les abeilles sont capables non seulement de percevoir le bouquet floral de la fleur proposée, mais également de mémoriser l'association établie pendant plusieurs jours entre ce parfum et la récompense sucrée. Dans la nature, ce phénomène d'apprentissage associatif et de la mémoire qui est générée est intrinsèque aux mécanismes de la constance florale, un comportement exprimé par les butineuses et qui consiste à restreindre leur activité de fourragement à seulement quelques espèces florales tant que celles-ci fournissent du nectar [8]. Dès lors que la période de floraison de l'espèce se termine, les abeilles ajustent leur comportement et cessent de venir les butiner pour se réorienter vers d'autres

fleurs qui se mettent à produire pollen et nectar. La constance florale semble refléter la capacité d'apprendre les caractéristiques des fleurs, en se basant sur leur couleur, leur odeur, leurs motifs, et celle de les exploiter comme indices de la récompense alimentaire associée. La complexité et la richesse du comportement des abeilles sont une chance pour l'étude de l'apprentissage et de la mémoire. Néanmoins, les travaux préliminaires réalisés par von Frisch par exemple se heurtent à plusieurs limites - méthodologiques et techniques - pour qui veut aborder l'étude des bases neurobiologiques des fonctions cognitives démontrées ici.

D'une part, l'étude rigoureuse des bases neurobiologiques de l'apprentissage requiert de la part de l'expérimentateur de maîtriser le protocole employé afin d'éviter l'influence de biais éventuels, et ceci en passant par le contrôle des paramètres intrinsèques aux informations perçues par l'animal. Maîtriser le protocole permet ainsi d'en assurer la reproductibilité expérimentale et la robustesse au cours du temps, mais également dans d'autres lieux ou par d'autres personnes, dès lors que les conditions établies dans l'expérience princeps sont respectées.

D'autre part, la réponse comportementale évoquée par l'animal doit être quantifiable et donc reposer sur des critères objectifs de réussite, de durée, ou sur tout autre score de performance ne faisant pas appel à une interprétation subjective. Lorsque c'est l'abeille elle-même qui est au contrôle de la situation, qui n'est alors pas gérée par l'expérimentateur, il devient impossible de contrôler

les stimuli conditionnels et inconditionnels, à la fois en terme de temps, d'intensité ou de reproductibilité. Enfin, il est primordial pour la poursuite de ces études neurobiologiques que le cerveau soit accessible aux techniques invasives comme la pharmacologie, l'électrophysiologie, ou encore l'imagerie calcique, et ceci n'est donc plus compatible à la simple observation des comportements d'abeilles en libre vol.

Afin de réunir tous ces critères, l'expérimentateur doit donc passer des observations de terrain aux conditions contrôlées d'un laboratoire, au sein duquel des protocoles rigoureux et standardisés de conditionnement peuvent être développés sur des animaux en contention pour permettre l'expérimentation dans des conditions pourtant restrictives et stressantes pour l'animal. Les protocoles les plus utilisés pour l'étude de l'apprentissage associatif chez l'abeille reposent généralement sur le conditionnement du réflexe d'extension des pièces buccales, constituées notamment par le proboscis, également appelé trompe, dans le cadre de l'étude de la modalité appétitive. Ce réflexe est exprimé chez des abeilles affamées, à chaque fois que les récepteurs gustatifs présents sur les tarsi, les antennes ou les pièces buccales entrent en contact avec une solution sucrée. De la même façon, les animaux peuvent également être soumis à un conditionnement du réflexe d'extension de leur dard s'il s'agit d'explorer la modalité aversive. Ce réflexe est, dans ce cas, déclenché au laboratoire par une stimulation électrique de l'organisme [9, 10]. Dotée d'un système nerveux central relativement simple ne comportant que 960 000 neurones [11] en



FIGURE 1.2 – Réflexe d’extension du proboscis, inné ou conditionné par un apprentissage associatif appétitif. D’après Matsumoto et coll. (2012) [12].

comparaison aux 85 milliards du cerveau humain, l’abeille permet à l’expérimentateur d’accéder aisément aux mécanismes et à l’organisation neuronale des processus de l’apprentissage et de la mémoire.

1.1.3 Apprentissage et mémoire de l’abeille au laboratoire.

Le conditionnement du réflexe d’extension du proboscis (REP) est un apprentissage associatif qui suit strictement le schéma de type Pavlovien, qui consiste à faire associer à l’abeille la présentation simultanée (ou légèrement décalée dans le temps) d’un stimulus initialement neutre comme une odeur ou une couleur, appelé stimulus conditionnel (SC) à un stimulus inconditionnel (SI) porteur d’une signification biologique, comme par exemple une récompense appétitive. Dans le cas du conditionnement olfactif appétitif reposant sur une

association entre odeur et sucre, la congruence des deux stimuli est facilement acquise par l'abeille car cela fait partie de son répertoire comportemental naturel, lorsque au cours du butinage elle associe l'odeur d'une fleur à la présence de nectar. Ce conditionnement exploite l'existence d'une boucle-réflexe appétitive entre les antennes et les motoneurones extenseurs du proboscis, l'abeille sortant de façon automatique ses pièces buccales lorsque ses antennes entrent en contact avec une substance sucrée. L'extension conditionnée du proboscis est représentée dans la Figure 1.2 (page 9). L'expérimentateur fait alors usage de ce réflexe pour pouvoir donner la récompense à l'abeille de façon congruente à l'odeur par le simple fait de toucher les antennes avec une solution sucrée, généralement apportée sur une petite pique en bois ou une micropipette. La répétition de cette association induit l'établissement d'une trace associative dans le cerveau de l'animal, qui répond alors à la seule présentation de l'odeur conditionnée. Cet apprentissage est largement employé depuis une cinquantaine d'années [12,13], et permet non seulement d'accéder aux bases neuronales impliquées dans ces processus, mais est également propice à l'élaboration de nombreuses variantes dans l'idée de rajouter de la complexité, notamment par des stimulations mixtes multi-sensorielles (visuelles, gustatives, olfactives ou encore mécaniques), ou de combiner des approches de pointe comme l'imagerie calcique *in vivo*, l'électrophysiologie ou les techniques de cages moléculaires. Avant le conditionnement, l'odeur seule (SC) ne déclenche aucune réponse comportementale car elle n'est porteuse d'aucune signification innée pour l'animal.

Au cours des essais répétés du conditionnement, la présentation de la récompense sucrée (SI) est simultanée - ou légèrement retardée dans le temps - à l'application de l'odeur [2], ce qui permet avec le temps la formation d'une mémoire de cette association qui est d'autant plus renforcée que la présentation odeur/sucre est répétée et que les essais sont suffisamment espacés dans le temps [14]. La mémoire qui en découle peut être restituée par la simple présentation de l'odeur seule qui suscite alors l'extension du proboscis par anticipation de la récompense associée ; cette mémoire s'exprime jusqu'à plusieurs jours après le conditionnement (mémoire dite à long terme) et dès la fin de la consolidation (mémoire à court et moyen terme). Plusieurs phases de mémoire ont été identifiées, et seront discutées plus loin.

La première étude rapportée d'un conditionnement olfactif du REP en laboratoire a été menée par Takeda [1] suite aux travaux de Kuwabara dans les années 50 sur le conditionnement visuel associatif entre une lumière et une récompense sucrée. Bitterman améliore par la suite le protocole [2] qui constitue de nos jours la base de toutes les méthodes de conditionnement olfactif. Ces techniques ont permis de découvrir et d'approfondir nos connaissances au cours des années sur les bases neuronales de l'apprentissage et de la mémoire chez l'abeille, au niveau anatomique mais également fonctionnel par l'emploi d'approches d'imagerie, de pharmacologie et d'électrophysiologie.

Plus récemment, un nouveau volet s'est ouvert dans l'histoire des études chez l'abeille, grâce au conditionnement du réflexe d'extension du dard (RED) en



FIGURE 1.3 – Réflexe d'extension du dard, inné ou obtenu par un apprentissage associatif aversif. D'après Tedjakumala et coll. (2013) [10].

réponse à la présentation simultanée d'un stimulus conditionnel et d'un léger choc électrique - en tant que stimulus inconditionnel - qui induit de façon innée la sortie du dard pour la défense contre l'attaque perçue par l'animal [9, 10]. L'extension conditionnée du dard est représentée dans la Figure 1.3 (page 12). L'association répétée des stimuli permet, de la même façon qu'en modalité appétitive par le conditionnement du REP, la formation d'une mémoire qui peut être restituée par la simple présentation de l'odeur seule qui suscite alors l'extension du dard par anticipation de la punition associée. Ici encore, plusieurs phases de mémoire séquentielles sont connues [15]. En revanche, les protocoles élaborés sur ce conditionnement en modalité aversive ne sont restreints, jusqu'à présent, qu'à des variantes limitées en terme de complexité cognitive, à savoir des apprentissages simples de type absolu et différentiel [9, 10], qui seront détaillés plus loin dans ce chapitre.

Chez l'abeille, et quelque soient les protocoles associés, on distingue classi-

quement trois types de mémoire, à savoir les formes de mémoire à court et moyen terme qui sont labiles, et la mémoire à long terme qui est stable dans le temps. Cette stabilité s'acquiert par une étape de consolidation impliquant différents acteurs génétiques et moléculaires : des facteurs de transcription de gènes cibles, des protéines kinases (PK), des molécules énergétiques telles que l'AMPc ou la GMPc notamment. Les différentes phases connues de la mémoire chez l'abeille sont représentées, de façon linéaire pour en simplifier la lecture, dans la Figure 1.4 (page 14). Les phénomènes des phases de mémorisation, ainsi que leurs mécanismes sous-jacents, ne semblent effectivement pas être aussi linéaires que tels que représentés dans la figure, puisqu'il apparaît que ces mécanismes peuvent être indépendants en terme de dynamique de formation des différentes mémoires connues [15]. La mémoire qualifiée à court terme dure de quelques secondes à quelques minutes [16, 17], et peut être induite par un seul essai de conditionnement ; celle à moyen terme dure de quelques heures à un jour et nécessite pour cela de trois à cinq essais de conditionnement espacés dans le temps par un court intervalle dit inter-essais (IIE). Enfin, la mémoire à long terme peut durer plusieurs jours, voire plusieurs semaines, et se forme après plusieurs essais de conditionnement espacés. Cette mémoire peut être subdivisée en mémoire à long terme précoce de 24 à 48 heures après conditionnement dépendante de la traduction d'ARN messagers déjà présents (ARNm), et en mémoire à long terme tardive dépendante de la transcription de nouveaux gènes puis de la traduction de protéines [16]. Cette synthèse de

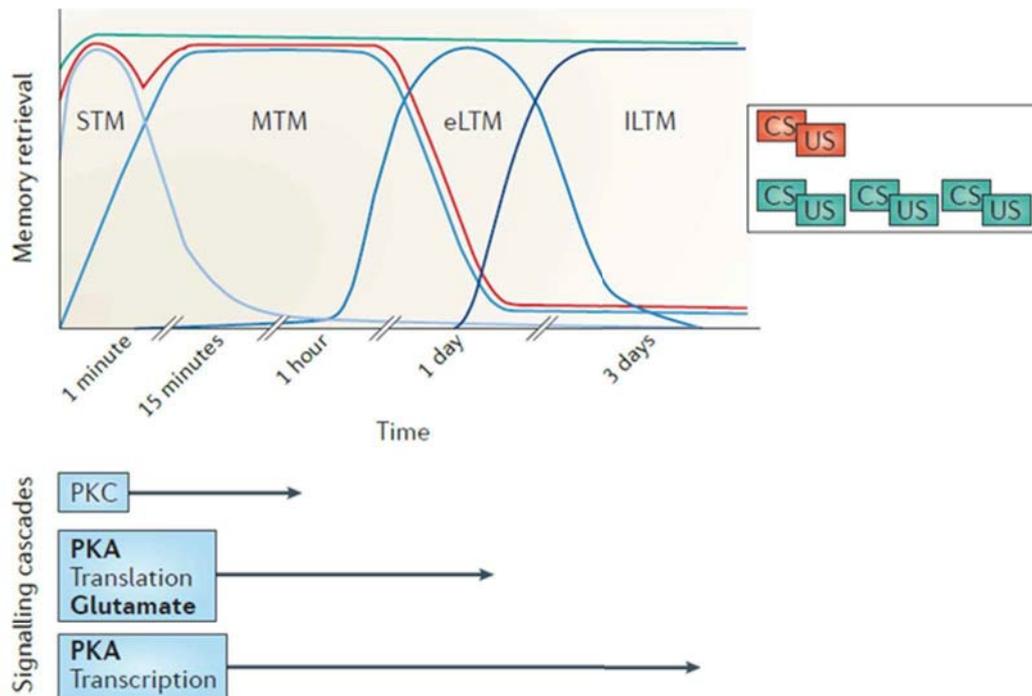


FIGURE 1.4 – Les multiples phases de la formation de la mémoire chez l’abeille. Le conditionnement du REP en un seul essai entraîne la formation de la mémoire à court et moyen terme (STM et MTM, en Anglais), tandis que des essais répétés entraîne la formation de la mémoire à long terme tardive puis précoce (e-LTM et l-LTM, respectivement). Les récepteurs cholinergiques du circuit olfactif sont activés par une odeur (CS, en Anglais), et le neurone octopaminergique VUMmx1 est activé par le sucre et entraîne l’initiation d’une signalisation représentée en bas. La transition entre la mémoire à court et moyen terme dépend de la protéine kinase C (PKC). Une voie moléculaire parallèle impliquant la PKA permet la transition en mémoire à long terme précoce (e-LTM). La phase tardive dépendante de la traduction (l-LTM) est initiée par la suite ou en parallèle à la phase précoce. D’après Menzel (2012), modifié d’après Müller (2002) [16, 17].

protéines *de novo* va permettre la mise en place de changements structuraux et de réorganisation des assemblées neuronales permettant l'établissement d'une trace mnésique stable dans le temps.

L'existence de ces profondes modifications engendrées par l'établissement d'une mémoire olfactive associative a été démontrée chez l'abeille au niveau de deux structures cérébrales décrites plus loin : dans les lobes antennaires (LA) puis dans les corps pédonculés (CP). Les travaux de Hourcade et coll. [18] ont démontré qu'après un conditionnement olfactif du REP, il était observé une augmentation de volume des glomérules des lobes antennaires, qui constituent les unités structurelles et fonctionnelles au sein desquelles des connexions sont établies entre les neurones du circuit olfactif et le neurone signalisant la récompense sucrée [18]. De même, des modifications structurales sont également visibles au niveau des micro-glomérules des corps pédonculés, qui constituent aussi un centre de convergence avec le neurone apportant l'information du sucre [18]. Ces travaux mettent donc en avant la plasticité du cerveau de l'abeille en relation avec la mise en place de la mémoire associative, et les structures cérébrales qui sont impliquées sont désormais bien connues et seront détaillées ci-après.

1.1.4 Les formes élaborées d'apprentissage.

Les protocoles de conditionnement développés en laboratoire permettent d'explorer les capacités cognitives naturelles des animaux. Ils ont permis de

dépasser la trame classique des sciences du comportement en étudiant des formes plus élaborées d'apprentissage, qui sont généralement distinguées en deux catégories.

Le premier niveau d'apprentissage, dit « élémentaire », implique une relation linéaire et non ambiguë entre les stimuli qui sont associés, lorsque par exemple l'odeur A est associée à une récompense alimentaire alors que l'odeur B ne l'est pas, dans le cadre d'un conditionnement olfactif appétitif [19]. Ce paradigme différentiel est encodé comme $A^+ B^-$, où le signe « + » traduit l'association de l'odeur au renforcement. Le second niveau d'apprentissage, dit « non élémentaire », concerne les relations complexes et ambiguës entre les stimuli, ce qui inclue les concepts d'apprentissage contextuel, de catégorisation et d'abstraction, tels que les principes de similarité ou de différence entre éléments et les concepts qui touchent aux relations entre objets [5]. Certains protocoles constituent des apprentissages purement non élémentaires, dans la mesure où leur résolution n'admet que l'utilisation d'une stratégie non linéaire considérant les éléments comme des entités indépendantes dans leur association avec le renforcement [5, 20, 21]. Il s'agit notamment du protocole de *patterning* négatif, pour lequel deux stimuli seuls sont renforcés tandis que le mélange des deux est non renforcé, dont le paradigme peut être encodé comme : $A^+ B^+ AB^-$ [22, 23]. L'animal doit alors apprendre à répondre aux éléments isolés, mais non au composé, ce qui est contraire au réflexe inné qui pousserait à répondre de façon deux fois plus importante à une combinaison de deux éléments

renforcés en eux-mêmes. L'ambiguïté du renforcement étant ici portée par les deux éléments isolés également présents dans le mélange composite, seule la résolution non élémentaire permet d'apporter une solution au problème proposé, c'est-à-dire en traitant le mélange AB comme une forme indépendante de la somme de ses constituants, soit que : $AB^- \neq [A^+ + B^+]$ [20]. Il apparaît en effet qu'un mélange olfactif binaire d'odeurs ne soit pas traité ni encodé chez l'abeille comme une entité émergente distincte de ses composantes, puisque des abeilles conditionnées sur un mélange olfactif AB^+ répondent également aux deux odeurs isolées A et B lors d'un test de mémoire [24], ce qui suggère fortement qu'elles sont capables de percevoir les éléments au sein du mélange et écarterait alors l'hypothèse du principe d'émergence, qui proposerait que $[A + B] \neq [A] + [B]$ [23, 25]. D'autres protocoles, bien que complexes et ambigus, ne constituent pas des problèmes strictement non élémentaires au sens théorique, car ils admettent une résolution aussi bien par chacune des deux stratégies cognitives. Dans ce cadre et sous un angle olfactif, cette ambiguïté peut par exemple être établie de nature temporelle, comme dans le protocole d'inversion de consigne pour laquelle, dans une première phase, l'odeur A est renforcée et l'odeur B est non renforcée ($A^+ B^-$), puis dans une seconde phase, les contingences sont inversées puisque A devient non renforcée et B devient renforcée ($A^- B^+$). Dans ce cas, chacune des phases est non ambiguë en elle-même, mais l'inversion du sens du renforcement crée une ambiguïté transitoire qui peut être résolue à l'échelle du stimulus ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). L'ambiguïté

peut également exister au niveau de stimuli présentés dans une configuration particulière, comme dans une tâche de *feature* négatif, où l'odeur A est renforcée tandis qu'un mélange binaire de l'odeur A avec une seconde odeur B n'est pas renforcé ($A^+ AB^-$). Dans ce protocole, le renforcement de A est équivoque puisque dépendant du contexte olfactif [26], les animaux devant répondre à A à moins qu'il ne soit congruent à B au sein du mélange. Ce problème peut être résolu à la fois de façon élémentaire par une résolution linéaire, ou de façon non élémentaire par une résolution dite non linéaire. La première stratégie implique d'apprendre que l'odeur B est un inhibiteur conditionné qui supprime de par sa valence « non renforcée » la réponse conditionnée au mélange, d'après la théorie de Rescorla et Wagner qui prédit que l'effet du renforcement sur le changement de la force associative d'un composant du mélange dépend des forces associatives de l'ensemble de ses composants [19], soit que $AB = [A + B]$. La seconde stratégie implique que l'animal traite le motif AB soit comme la somme de ses composants plus un stimulus configural supplémentaire ($AB = A + B + \mu$) d'après la théorie de l'indice unique de Rescorla et Wagner [19], soit comme étant à l'origine d'une représentation interne nouvelle ($AB = X$), d'après la théorie configurale de Pearce [27]. Dans tous les cas, la résolution de type non élémentaire prédit que le mélange sera traité comme une configuration unique et distincte de la somme linéaire de ses composantes, soit que $AB \neq [A + B]$.

Chez les mammifères, la capacité de résoudre les tâches cognitives non élémen-

taires requiert des structures cérébrales qui sont anatomiquement et fonctionnellement distinctes, et en particulier l'hippocampe qui est considéré comme dispensable pour les apprentissages élémentaires mais indispensable pour les tâches plus complexes notamment dans les apprentissages spatiaux [28]. Ces facultés cognitives, référées en tant qu'apprentissages configuraux par Pearce en 1987 et 1994 [27] ont été largement explorées chez les vertébrés et également dans une certaine mesure chez certains insectes, particulièrement chez les abeilles [21–23]. Jusqu'à présent, les preuves de ces capacités d'apprentissage chez l'insecte sont très limitées et souvent incertaines, et la majorité des connaissances sur l'apprentissage associatif olfactif chez le modèle drosophile par exemple provient d'études de niveau élémentaire et où la réponse comportementale est mesurée en tant que choix entre deux stimuli proposés, hormis certains travaux explorant des capacités plus élaborées [29]. Une quantité considérable d'études a été effectuée afin de comprendre les régions cérébrales et les mécanismes neuro-génétiques impliqués dans ces associations [30–32] et également accéder à des niveaux supérieurs de capacités cognitives. Les drosophiles semblent ainsi pouvoir distinguer des mélanges binaires dont des mélanges présentant des chevauchement de composantes olfactives ($AB^+ BC^-$) et résoudre des problèmes de type *patterning* positif ($A^- B^- AB^+$) mais non des tâches plus ambiguës, comme de *patterning* négatif ($A^+ B^+ AB^-$) ou de discrimination bi-conditionnelle ($AB^+ CD^+ AC^- BD^-$) [29] dans le cadre de conditionnements basés sur des appariements d'odeurs à des stimuli aver-

sifs [33] ou appétitifs [34]. Chez l'abeille, l'ensemble de la variété des protocoles a bien été explorée en modalité appétitive, notamment les apprentissages de *patterning* négatif et positif ($A^+ B^+ AB^-$ et $A^- B^- AB^+$ respectivement) qui ont été démontrés à travers le conditionnement du réflexe d'extension du proboscis [22,23] et également chez des animaux en libre vol en utilisant des combinaisons de couleurs et d'odeurs [35,36] mais jamais encore dans le cas d'un conditionnement en modalité aversive [5]. Des tâches équivalentes d'apprentissage multimodal dépendant du contexte, où les valences des renforcements d'odeurs variant en fonction de la lumière peuvent être résolues par d'autres espèces d'insectes, comme les grillons ou les blattes [37], mais dont semblent cependant incapables les mouches [38].

Néanmoins ces facultés cognitives extraordinaires ne doivent pas être attribuées à des processus « magiques » ou du moins anthropomorphiques, car même le plus complexe des comportements repose sur des concepts d'apprentissage associatif et sur des bases moléculaires et neuronales que l'expérience scientifique permet d'expliquer. Les travaux portant sur les bases neuronales des capacités d'apprentissage et de mémoire ont pour objectif ultime de décrypter et comprendre les phénomènes moléculaires et cellulaires en jeu dans les assemblées neuronales, qui permettent la formation et la consolidation dans le temps de la trace mnésique des associations entre stimuli. Le système nerveux central est composé de structures anatomiquement et fonctionnellement dis-

tinctes, qui sont globalement bien conservées entre les espèces d'insectes même si leur organisation morpho-anatomique et leurs rôles fonctionnels sont susceptibles de varier. Les voies de l'apprentissage appétitif et aversif seront décrites chez l'abeille dans les paragraphes ci-dessous, d'après les études classiquement réalisées et l'état des connaissances actuel.

1.2 La transmission du signal olfactif.

Dans le cas de l'apprentissage olfactif, les stimuli associés sont constitués d'une part par une odeur, le stimulus conditionnel (SC), et d'autre part par un stimulus inconditionnel (SI), soit une récompense alimentaire de solution sucrée pour l'apprentissage appétitif, soit une punition nociceptive pour l'apprentissage aversif. Dans tous les cas cet apprentissage nécessite le traitement et la convergence à la fois d'informations olfactives et gustatives ou nociceptives dans le système nerveux central. Le cerveau de l'abeille mesure environ 1mm^3 et est composé de 960 000 neurones [11, 39]. Ses différentes aires sont représentées dans la Figure 1.5 (page 22). Ce cerveau est capable de recevoir et de traiter des informations appartenant aux différentes modalités sensorielles : *(i)* des informations visuelles issues des yeux simples et composés, *(ii)* des informations olfactives en provenance des antennes principalement, *(iii)* des informations gustatives issues des pièces buccales principalement (mais aussi des antennes et des tarsi), et enfin *(iv)* des informations tactiles et mécanosensorielles. Tous ces signaux sont envoyés dans des aires primaires de relais du

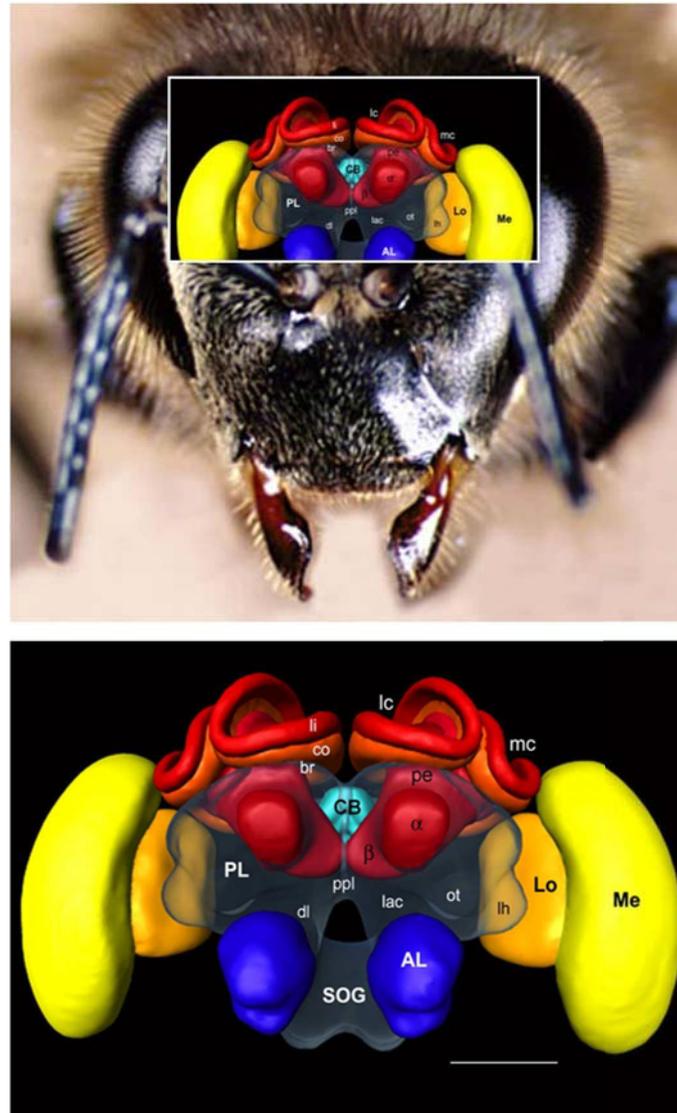


FIGURE 1.5 – Représentation du cerveau de l'abeille en place dans la capsule céphalique (en haut) et détaillé *ex situ* (en bas). Les différents neuropiles sont définis par convention par différentes couleurs : corps pédonculés (en rouge), lobes antennaires (en bleu) et lobes optiques (en jaune). Les composants du cerveau moyen sont fusionnés en transparence pour simplifier la représentation. La barre d'échelle représente $300 \mu\text{m}$. Les abréviations sont en Anglais ; CB : corps central ; PL : lobe protocérébral ; ppl : lobe protocérébral postérieur, Lo : lobula ; Me : medulla, li : lèvres, co : collier, br : anneau basal, lh : corne latérale, ot : tubercule optique, lac : lobe accessoire latéral, mc : calice median, lc : calice lateral, pe : péduncule, α : lobe alpha vertical, β : lobe médian beta, SOG : ganglion sous-oesophagien. Modifié d'après Rybak et coll. (2010) [40].

système nerveux central puis transférés dans des structures d'ordre supérieur qui en assurent la congruence et l'établissement de traces mnésiques. Ces traces mnésiques s'établissent également dans d'autres aires primaires, telles que les lobes antennaires ou les cornes latérales, en plus des aires d'ordre supérieur.

1.2.1 Les neurones sensoriels olfactifs des antennes.

Les molécules odorantes sont des composés volatiles hydrophobes, que l'insecte capte au niveau des principaux organes olfactifs, les antennes. Les odeurs pénètrent dans des structures spécialisées de l'antenne dites sensilles, par des pores dans la cuticule de leur paroi. Elle se lie à des protéines circulantes qui les transportent à travers l'hémolymphe réceptrice sensillaire jusqu'aux expansions dendritiques des neurones sensoriels olfactifs (NSO) qui présentent des récepteurs moléculaires sur lesquels se fixent spécifiquement les molécules odorantes. La fixation des molécules odorantes sur les récepteurs génère par la suite la formation d'un potentiel récepteur qui, s'il est suffisant, déclenche un potentiel d'action au niveau de l'axone du neurone sensoriel olfactif. Ces neurones envoient leurs axones regroupés au sein du nerf antennaire (NA) qui parcourt toute l'antenne jusqu'aux lobes antennaires.

1.2.2 Les lobes antennaires.

Le nerf antennaire est constitué des axones des neurones sensoriels olfactifs répartis en tracta qui transmettent les informations olfactives à différentes

régions du lobe antennaire. Certains tracta innervent principalement la région ventrale du lobe tandis que d'autres innervent la région dorsale [41]. Les 60 000 NSO innervent les glomérules, unités structurales et fonctionnelles des lobes antennaires, au nombre de 165 chez l'abeille, au sein desquelles des connexions sont établies entre les afférences de trois types majeurs de neurones : les NSO, les neurones de projection (NP), et les inter-neurones locaux (IL) qui s'arborisent à l'intérieur des glomérules afin d'assurer la communication intra et inter-glomérulaire. Chez l'abeille, on compte environ 4000 IL majoritairement inhibiteurs. Environ 750 d'entre eux sont marqués pour le GABA [42, 43] alors que d'autres neurotransmetteurs et circuits excitateurs ont également été identifiés chez la drosophile, comme le glutamate [44]. Tous les NSO exprimant le même type de récepteur convergent au sein du même glomérule. L'information traitée est ensuite transmise par les neurones de projections (NP) qui intègrent les signaux issus d'un seul glomérule (NP uni-glomérulaires) ou de plusieurs (NP multi-glomérulaires) vers des régions supérieures du circuit olfactif. Les neurones de projection forment ensuite le tractus antennaire-lobe (ALT ; en anglais *Antennal Lobe Tractus*) réparti en tractus latéral (l-ALT, anciennement l-APT) et médian (m-ALT, anciennement m-APT) qui constituent deux voies olfactives parallèles [39]. La voie l-ALT est formée par le tractus du nerf antennaire arborisé dans les glomérules en position dorsale. La seconde voie m-ALT reçoit les informations des tracta qui se projettent sur les glomérules en position ventrale. Les neurones de projection transmettent ensuite les infor-

mations olfactives au niveau de structures cérébrales plus centrales : la corne latérale et les corps pédonculés.

1.2.3 La corne latérale.

Les afférences olfactives s'arborisent entre autres dans la corne latérale (CL), une aire cérébrale supérieure dont l'activité neurale semble très sensible aux stimulations par des odeurs florales ou des phéromones [45]. Le tractus l-ALT projette d'abord ses collatérales dans la CL puis dans un second temps au niveau des calices des corps pédonculés, tandis que le tractus m-ALT se projette sur les calices puis se termine au niveau de la CL. Les fonctions de la corne latérale sont encore peu connues, mais cette structure semble constituer l'un des centres de prise de décision ainsi qu'une voie de sortie vers l'exécution motrice, et semble également présenter une carte odeur-spécifique avec des représentations distinctes des différentes phéromones chez l'abeille à l'origine de divers comportements spécifiques [45].

1.2.4 Les corps pédonculés.

Chez l'abeille, il a été démontré que les capacités d'apprentissage ambigu sont associées à la présence de corps pédonculés intacts et fonctionnels, qui constituent des centres cognitifs d'ordre supérieur [11, 22, 36, 46–48] alors que ces structures ne semblent pas nécessaires à la résolution de tâches plus simples d'apprentissage associatif [48].

Les corps pédonculés sont constitués d'une zone recevant les afférences sensorielles appelée les calices (un calice médian et un calice latéral par hémisphère) et de zones d'efférences appelées lobes (un lobe vertical et un lobe médian par hémisphère) reliés aux calices par un pédoncule, comme présenté sur la Figure 1.5 (page 22). Certaines afférences paraissent également arriver au niveau du pédoncule, mais celles-ci sont mal connues [49]. Les neurones intrinsèques qui composent les corps pédonculés sont les cellules de Kenyon (CK), dont les corps cellulaires sont majoritairement regroupés sur les faces internes et externes des calices. Chez l'abeille, 320 000 CK ont été dénombrées, soit 160 000 neurones par corps pédonculé dans chaque hémisphère. Les afférences olfactives des NP atteignent le calice au niveau de la lèvre - zone uniquement olfactive - et l'anneau basal, qui est multimodal (olfactif, gustatif et mécano-sensoriel), comme présenté dans le haut de la Figure 1.9 (page 36). Les contacts synaptiques entre les axones des neurones de projection et les dendrites des cellules de Kenyon constituent des micro-glomérules (à distinguer des glomérules des lobes antennaires), dont le coeur est constitué du bouton pré-synaptique (NP) entouré des éléments post-synaptiques (CK). Une augmentation de la densité de ces micro-glomérules au sein des lèvres des calices a été observée chez des abeilles ayant formé une mémoire à long terme [18] ce qui suggère fortement une corrélation entre le degré de densification des contacts synaptiques au sein des calices et l'établissement d'une mémoire associative olfactive dépendante de la synthèse de protéines. Les cellules de Kenyon traitent et convoient l'in-

formation reçue le long du pédoncule jusqu'aux lobes verticaux et médians pour contacter les neurones extrinsèques efférents. L'organisation en couches des terminaisons axoniques des CK au sein du lobe vertical est en miroir de celle des calices ; les informations olfactives traitées au niveau de la lèvre se projettent dans la zone inférieure du lobe vertical et celles traitées au niveau de l'anneau basal se projettent dans la zone supérieure [49]. Les corps cellulaires des neurones efférents contactés par les CK sont localisés dans le protocérébron [50]. Ces neurones prennent l'information au niveau du pédoncule et des lobes, le neurone Pe1 en particulier montre une forte arborisation au sein du lobe vertical, puis projettent sur différentes parties du cerveau et notamment sur la CL [51, 52]. Les neurones centrifuges (NC) apportent un rétro-contrôle des corps pédonculés sur les lobes antennaires et pourraient être impliqués dans un mécanisme de modulation rétrograde des circuits des lobes antennaires [53]. En plus des neurones extrinsèques efférents et des NC, on retrouve d'autres neurones récurrents dont les somas sont localisés en partie antérieure latéralement au lobe vertical. Ces neurones prennent l'information au niveau des lobes verticaux et se projettent au niveau des calices et peuvent avoir des fonctions de rétrocontrôle par boucle récurrente d'inhibition au sein des structures qu'ils innervent ; l'anatomie et la fonction de ce type de neurones seront largement développées et discutées dans le paragraphe I.5.

1.2.5 La neurotransmission du signal olfactif.

La présence d'acétylcholine (ACh) a été détectée au niveau du système nerveux central et constitue le neurotransmetteur excitateur est le plus abondant dans le cerveau des insectes. Il a été démontré par l'injection d'antagonistes nicotiniques que la neurotransmission cholinergique et la fonctionnalité de ces récepteurs nicotiniques sont indispensables à l'apprentissage et à la mémoire chez l'abeille [54]. Des marquages immuno-histochimiques d'une enzyme de dégradation de l'acétylcholine ont montré sa présence au niveau de structures impliquées dans le traitement des informations olfactives et gustatives et des processus cognitifs (lobes antennaires, ganglion sous-œsophagien et corps pédonculés) et des tracta antenno-protocérébraux. La transmission des informations olfactives traitées par les lobes antennaires jusqu'aux calices des corps pédonculés repose donc sur une neurotransmission cholinergique [55].

1.3 La transmission du signal gustatif.

1.3.1 Les voies anatomiques du signal gustatif.

Lors d'un apprentissage appétitif chez l'abeille, le stimulus inconditionnel est constitué d'une récompense alimentaire sucrée, qui est captée par des récepteurs gustatifs et dont le signal est ensuite traité par les circuits représentés dans la Figure 1.6 (page 29). Ces afférences proviennent principalement des pièces buccales, mais également des antennes et des tarsi. Les neurones

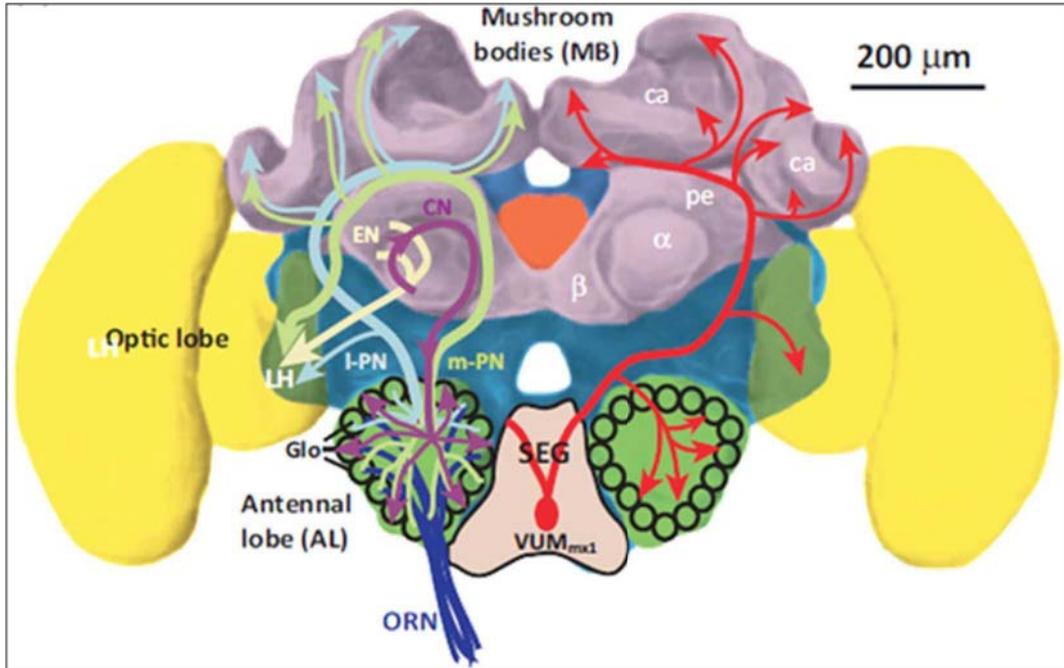


FIGURE 1.6 – Représentation schématique dans le cerveau d’abeille des innervations et de la contingence des voies neuronales transmettant l’information olfactive du stimulus conditionnel (en bleu, hémisphère gauche) et l’information gustative du stimulus inconditionnel (en rouge, hémisphère droit) impliquées dans l’apprentissage associatif appétitif. Le lobe antennaire (AL) reçoit les informations olfactives (en bleu), que les neurones de projection (PN) convoient ensuite par différents tracta jusqu’aux aires supérieures : corps pédonculés (MB) et corne latérale (LH). Les dendrites des cellules de Kenyon forment les calices (ca) et leurs axones le pédoncule (Pe) et les lobes verticaux α et médians β . Les neurones centrifuges (CN, en mauve) exercent une modulation rétrograde sur les lobes antennaires. Le signal gustatif apporté par le neurone VUM_{mx1} (en rouge) est envoyé au lobe antennaire, à la corne latérale et aux calices des CP. Modifié d’après Giurfa (2013) [5].

sensoriels gustatifs des antennes projettent au niveau du lobe dorsal tandis que ceux des pièces buccales projettent sur le ganglion sous-œsophagien, où ils contactent un neurone localisé en position médio-ventrale dans le neuromère maxillaire 1 (VUMmx1). Ce neurone octopaminergique répond de façon spontanée à une stimulation sucrée si bien que sa seule dépolarisation électrique artificielle peut mimer la présentation du sucre lors d'un conditionnement olfactif du REP [56]. Il en est de même pour l'injection directe d'octopamine en appariement à une odeur [57]. Ce neurone constitue, *via* la libération d'octopamine, l'un des éléments essentiels de la voie du stimulus inconditionnel. En effet les terminaisons axonales de VUMmx1 s'arborescent dans les lobes antennaires, les cornes latérales et les calices des corps pédonculés, c'est-à-dire dans les structures-clés du circuit olfactif et qui reçoivent des informations olfactives issues des neurones de projection.

1.3.2 La neurotransmission du signal gustatif.

Chez la drosophile, la mémoire appétitive à court terme est dépendante de la neurotransmission octopaminergique, mais nécessite également l'interaction d'une signalisation dopaminergique qui semble contrôler la motivation appétitive d'après de récentes découvertes [58]. Ces résultats suggèrent que la modalité gustative engage un signal octopaminergique renforçant la mémoire associative à travers des neurones dopaminergiques spécifiques en relation avec

les corps pédonculés, et indiquent que la catégorisation de chaque neurotransmission octopaminergique (pour l'appétitif) et dopaminergique (pour l'aversion) ne paraît plus tout à fait pertinente d'après les dernières données. Les systèmes de renforcement impliqueraient alors des signaux mixtes au niveau de certaines structures clés de la mémoire.

1.4 La transmission du signal nociceptif.

Dans le cas de l'apprentissage olfactif aversif, les stimuli associés sont constitués d'une odeur associée à un renforcement nocif qui est généralement assuré par un léger choc électrique, et impliquent donc la convergence au niveau central des informations olfactives et nociceptives, comme schématisé sur la Figure 1.7 (page 32). Ces informations sont relayées chez l'abeille par l'activité de trois principaux groupes de neurones dopaminergiques (clusters C1 à C3) localisés en partie inférieure médiane du protocérébron (C1), sous le lobe vertical (C2) ou en bordure supérieure du protocérébron sous les calices (C3). Tedjakumala et coll. [10] ont également identifié un quatrième groupe présent entre le lobe optique et la marge du calice latéral (C4). Ces neurones innervent inégalement les différentes structures du cerveau, mais connectent principalement les calices des corps pédonculés, les lobes verticaux et le corps central [10]. Il n'est cependant toujours pas connu si ces centaines de neurones agissent indifféremment de la même façon que le neurone VUMmx1, ce qui paraît peu probable, ou bien si des groupes différents sont dédiés à fournir

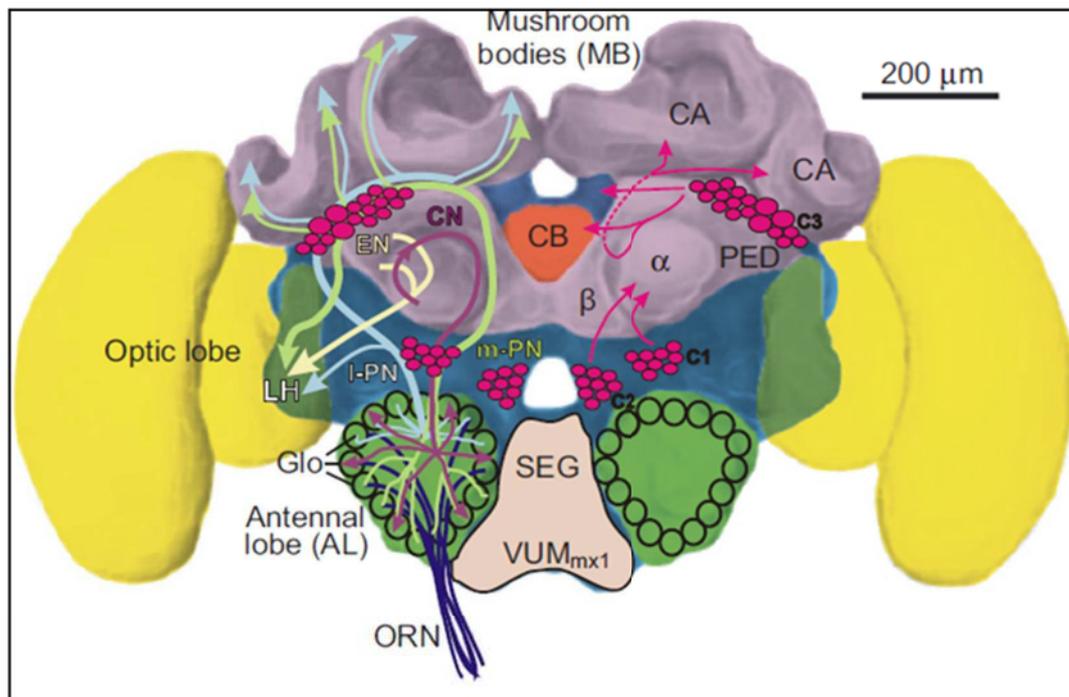


FIGURE 1.7 – Représentation schématique dans le cerveau d'abeille des innervations et de la contingence des voies neuronales transmettant l'information olfactive du stimulus conditionnel (en bleu, hémisphère gauche) et l'information nociceptive du stimulus inconditionnel (groupes de neurones dopaminergiques, en rose) impliquées dans l'apprentissage associatif aversif. Le signal nociceptif, potentiellement traité par les neurones dopaminergiques C1–C3 (en rose) est envoyé dans les lobes α verticaux, le corps central (CB) et les calices, où se fait la congruence avec le signal olfactif. Modifié d'après Tedjakumala et Giurfa (2013) [10].

différents types d'information, y compris pour des renforcements non aversifs.

En effet, la convergence avec le circuit olfactif n'implique pas nécessairement que tous ces neurones représentent le stimulus inconditionnel.

1.5 Les neurones récurrents des corps pédonculés.

Les neurones récurrents introduits dans le paragraphe I.2.4 constituent des neurones de type GABAergique extrinsèques des corps pédonculés retrouvés chez plusieurs espèces d'insectes, telles que fourmis, noctuelle, blatte, grillon et criquet [59], et bien entendu chez la drosophile [60,61] et l'abeille [11,50,62–64]. Les signaux inhibiteurs afférents aux corps pédonculés connus jusqu'alors sont apportés d'une part par les neurones récurrents en provenance du tractus protocérébro-calical (PCT) découverts chez l'abeille et le sphinx [62,65] dont il est question ici, et d'autre part, par d'autres neurones extrinsèques qui s'arborisent dans les calices et les lobes [59] et également des fibres arrivant sur le pédoncule et les lobes [62]. Malgré une connaissance détaillée de l'anatomie et de l'organisation des ces neurones, présentée dans la Figure 1.8 (page 34), leur circuiterie synaptique et leur fonction restent très peu connues.

1.5.1 Anatomie et organisation des neurones récurrents.

Chez l'abeille, les neurones récurrents du PCT appartiennent à un groupe de cellules appelées neurones A3 au sein des neurones récurrents (appelés FN pour *Feedback Neurons* en anglais) d'après les descriptions de Rybak et Menzel [50] illustrées dans la Figure 1.9 (page 36). Ils forment une sous-population de 50 à 60 fibres dans le cluster ventral (A3-v) sur une population estimée

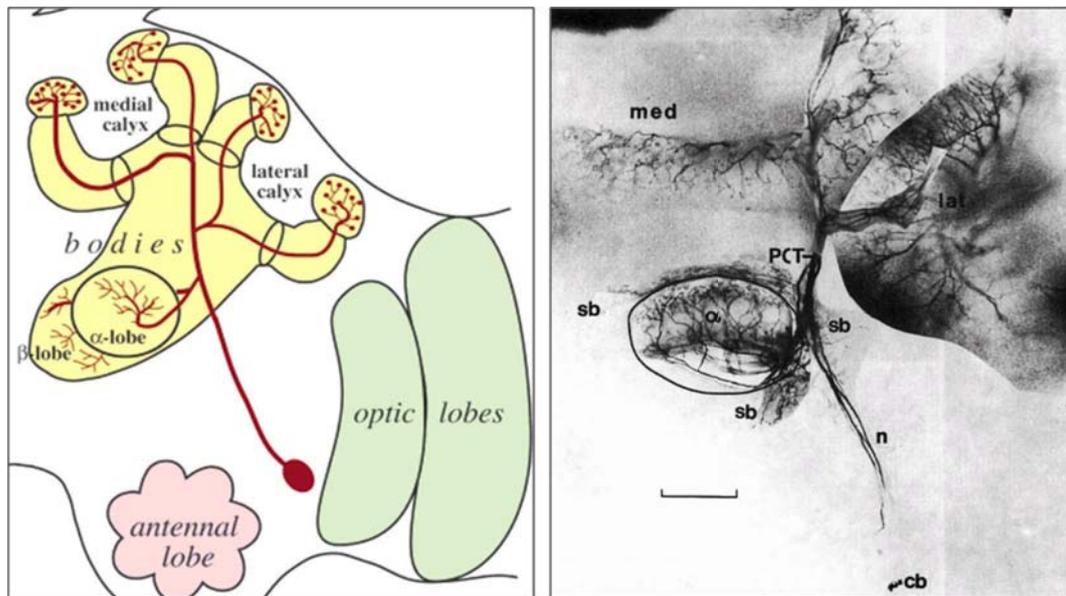


FIGURE 1.8 – A gauche, représentation schématique du circuit inhibiteur des neurones récurrents (en rouge) des corps pédonculés chez l’abeille. Leurs corps cellulaires, situé près des lobes optiques, projette ses expansions dendritiques au niveau des lobes où l’information est captée, traitée puis renvoyée au niveau de la lèvre des calices médians et latéraux, qui constitue la zone d’afférence olfactive des corps pédonculés. D’après Ganeshina et Menzel (2001) [43]. A droite, montage de plusieurs photo-micrographies d’une préparation entière à différentes profondeurs en vue frontale d’un groupe de quatre neurones récurrents marqués au cobalt chez l’abeille. Le pédoncule et le lobe β ne sont pas visibles. α : lobe vertical α ; cb : corps cellulaires; med, lat : calice médian et latéral; sb : branches des neurones récurrents en dehors des lobes verticaux; n : neurites; PCT : tractus protocérébro-calical. Les contours du lobe vertical sont indiqués en traits pleins, et la barre d’échelle représente 100 μm . D’après Gronenberg (1987) [63].

à 110 neurones immuno-réactifs au GABA appartenant aux corps pédonculés [50, 62]. Les corps cellulaires de ces neurones sont regroupés ventralement entre les lobes optiques et les lobes antennaires, à une profondeur d'environ 80 μm sous la surface du cerveau. L'anatomie de ces neurones ayant été bien décrite, il a été démontré qu'ils innervent les zones de sortie des corps pédonculés (lobes verticaux et médians) par des terminaisons synaptiques en épine, typiques de spécialisations post-synaptiques. Ils innervent également les aires d'entrée (calices latéraux et médians) en formant des varicosités souvent présentes dans les spécialisations pré-synaptiques [64].

Chez la drosophile, l'équivalent de cette structure est retrouvé dans les neurones pairs antérieurs latéraux des corps pédonculés (APL) qui ont été marqués par des drivers génétiques spécifiques (lignées GH_{146} , NP_{5288} et NP_{2631}) notamment par les études de Tanaka et coll. [60]. Leur corps cellulaire est localisé dans la marge dorsale du protocérébrum ventro-latéral près des lobes optiques. Le soma est de grande taille et émet une fibre qui projette dorso-médianement dans le cerveau postérieur et émerge avec le tractus interne ALT latéralement au calice. L'expansion se poursuit au sein de l'ALT puis pénètre dans le calice et s'arborise en région dorsale sur toute la surface de cette structure. La ramification très dense projette également sur une partie particulière, le calice accessoire, qui ne reçoit pas de signal olfactif de la part des neurones de projection. Contrairement aux autres neurones extrinsèques des corps pédonculés décrits par Tanaka et coll. [60], les neurones APL innervent par dizaines

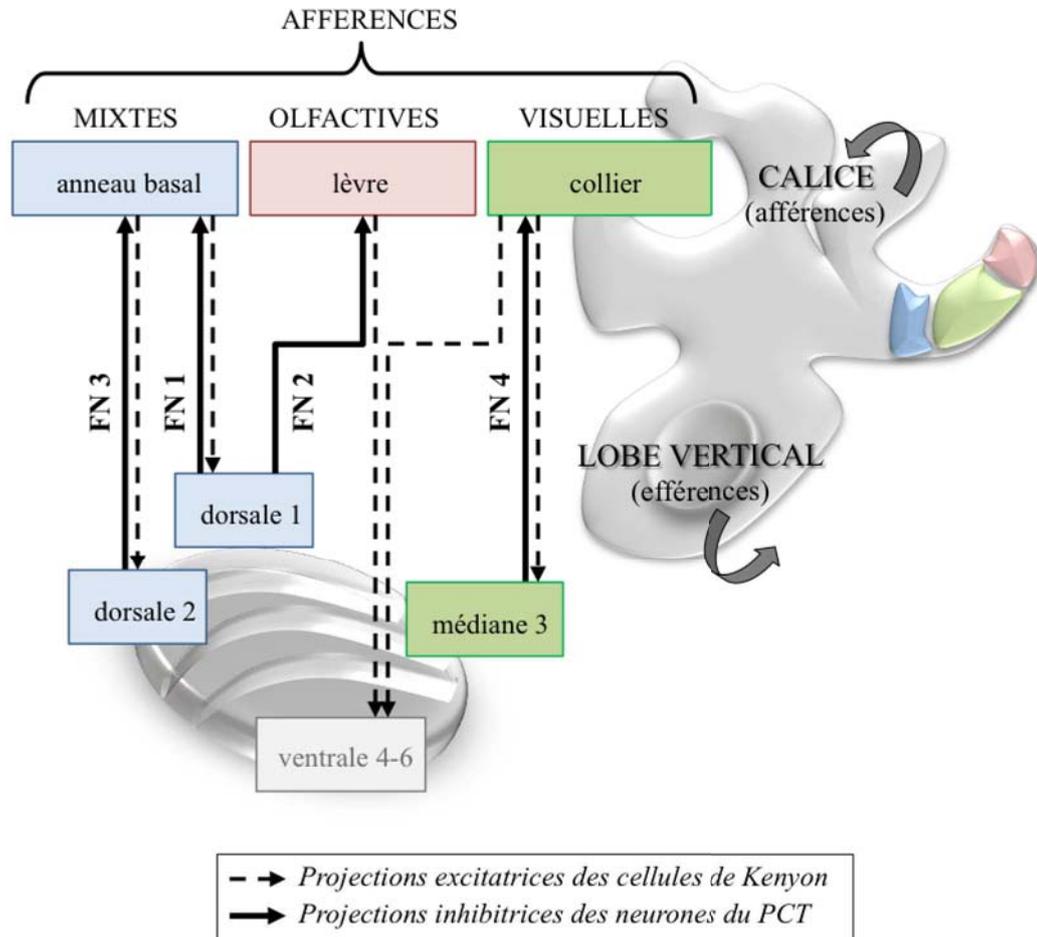


FIGURE 1.9 – Représentation schématique simplifiée de la circuiterie interne des neurones PCT au sein des corps pédonculés, entre les différentes couches du lobe vertical (en bas) et le calice. Les flèches indiquent le flux d'information, issu des cellules de Kenyon (traits en tiret) et des neurones récurrents PCT (traits pleins). Les afférences dans les calices sont réparties en fonction des sous compartiments, la lèvre (afférences olfactives), le collier (afférences visuelles) et l'anneau basal (afférences mixtes). Dans le lobe vertical, les cellules de Kenyon font synapse avec les neurones extrinsèques efférents (non visibles). Les neurones PCT (FN1–FN4) convoient de façon récurrente l'information des lobes aux calices. En plus de l'absence de correspondance du transfert d'informations par le groupe FN2, un sous-groupe de cellules de Kenyon de la région du collier termine ventralement dans les couches du lobe vertical [50] indiquant des connections non correspondantes. Modifié d'après Grünewald (1999) [53].

l'intégralité de la surface des corps pédonculés (lobes vertical et médian, pédoncule) de façon homogène et projettent de façon controlatérale sur l'autre hémisphère. Chez le criquet, des neurones GABAergiques connectent directement la corne latérale aux corps pédonculés et envoient un signal inhibiteur au niveau des calices, suggérant que les cellules de Kenyon jouent un rôle de détecteurs de coïncidence des informations olfactives issues des neurones de projection [66]. Cette afférence inhibitrice semble visiblement être la cause du codage dit "éparse", ou *sparse coding* en Anglais, typique de l'activité des cellules de Kenyon. Chez la blatte, des neurones similaires inhibent également le calice [67]. Leur activité de décharge étant supprimée quand les insectes sont soumis à certains stimuli sensoriels, ils sembleraient faciliter l'acquisition des signaux par les cellules de Kenyon [67].

1.5.2 Fonctionnalité et caractéristiques physiologiques.

Il a été démontré que les neurones récurrents PCT sont immuno-réactifs pour le GABA [62], un neurotransmetteur inhibiteur abondant dans le cerveau de l'abeille [44] et dont la structure chimique est présentée en Figure 1.10 (page 39). De par leur polarisation au sein des corps pédonculés, les neurones récurrents PCT pourraient exercer un rétro-contrôle négatif direct depuis les lobes jusqu'aux calices [11, 53]. Cette hypothèse est confortée par l'existence de potentiels post-synaptiques enregistrés dans les neurones PCT à la sortie des lobes verticaux, suggérant bien une excitation synaptique au niveau des

lobes [64]. Ces neurones pourraient également être responsables de la composante inhibitrice de la réponse oscillatoire évoquée par l'odeur conditionnée dans les cellules de Kenyon des corps pédonculés [68]. En effet les neurones PCT ont des propriétés de réponse modifiées après un conditionnement olfactif et pourraient de ce fait être impliqués dans la formation de la mémoire olfactive, notamment dans les cas d'associations complexes [64]. Néanmoins, la polarisation fonctionnelle des neurones PCT ne semble pas être une caractéristique conservée chez l'ensemble des insectes, puisque, d'une part, le neurone géant récurrent du criquet ne produit pas de potentiel d'action après injection d'un courant intracellulaire ou après une stimulation olfactive *in vivo* [59], et d'autre part, l'inhibition par le GABA semblerait avoir lieu à la fois dans les calices et dans les lobes chez la drosophile [60]. Une intense immuno-réactivité anti-GABA est observée chez la drosophile sur l'ensemble des lobes, du pédoncule et des calices des corps pédonculés [69]. Ces afférences inhibitrices sur les cellules de Kenyon semblent être primordiales pour les caractéristiques du profil de réponse suite à un apprentissage, aux corrélations inter-odeurs et aux capacités discriminatives spécifiques [70].

1.6 Le GABA et ses récepteurs.

L'acide γ -aminobutyrique, abrégé GABA, est le neurotransmetteur inhibiteur le plus abondant du système nerveux des animaux et joue un rôle central dans de nombreux processus physiologiques. Chez les mammifères, l'hippo-

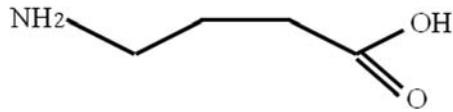


FIGURE 1.10 – Molécule de GABA. D’après Sattelle et coll. (1991) [71].

campe qui est une structure essentielle pour l’apprentissage et la formation de la mémoire, est innervé abondamment et son activité est modulée par des réseaux neuronaux GABAergiques [28]. D’une façon générale, les récepteurs impliqués dans la neurotransmission chimio-dépendante sont regroupés en deux grands types anatomiques et fonctionnels, représentés dans la Figure 1.11 (page 40).

D’une part, les récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (RCPG) sont des récepteurs à sept segments transmembranaires. La fixation du ligand ou de l’agent agoniste en partie extracellulaire active la protéine G intracellulaire qui à son tour active ou inhibe la production d’un second messager, principalement le calcium, l’AMPc ou le GMPc permettant la mise en place d’une cascade moléculaire de signalisation. Dans le cas des RCPG spécifiques pour le GABA, la protéine G intracellulaire, de type inhibitrice, réprime la production de seconds messagers et entraîne de ce fait l’hyperpolarisation de la membrane à l’origine de l’inhibition neuronale.

D’autre part, les récepteurs de type ionotropique (dits également LGIC pour *ligand-gated ion channel* en Anglais) sont des récepteurs canaux. Ils forment une structure protéique complexe constituée de sous-unités transmembranaires

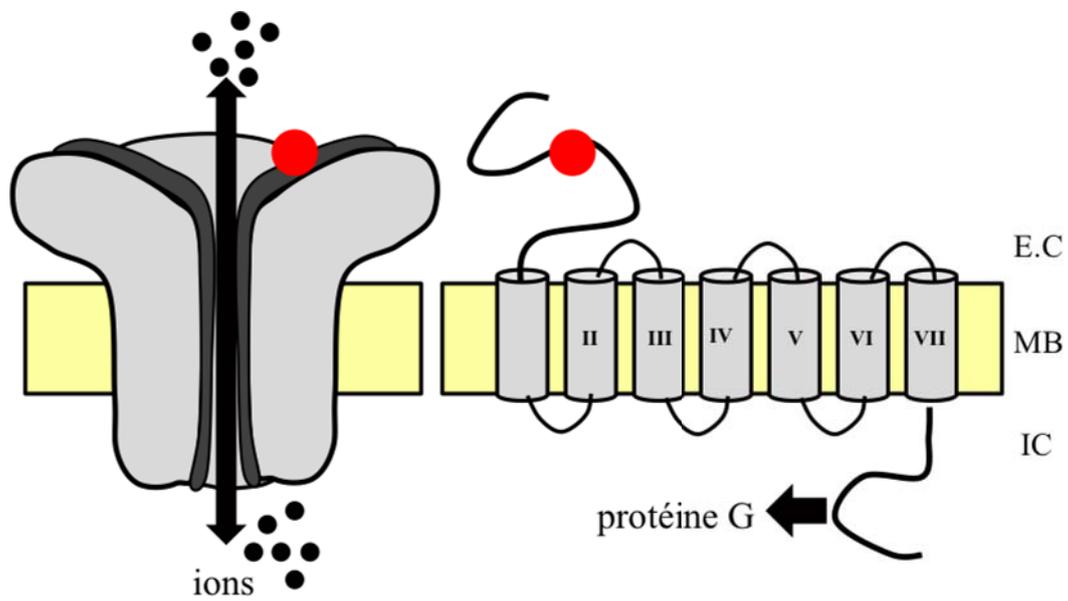


FIGURE 1.11 – Schéma simplifié d'un récepteur-canal de type ionotropique (à gauche) et d'un récepteur métabotrope couplé à une protéine G à sept domaines transmembranaires (à droite). Le site de fixation du ligand est représentée par le disque rouge. EC : compartiment extra-cellulaire ; MB : membrane ; IC : compartiment intra-cellulaire. Modifié d'après Barbara (2007) [72].

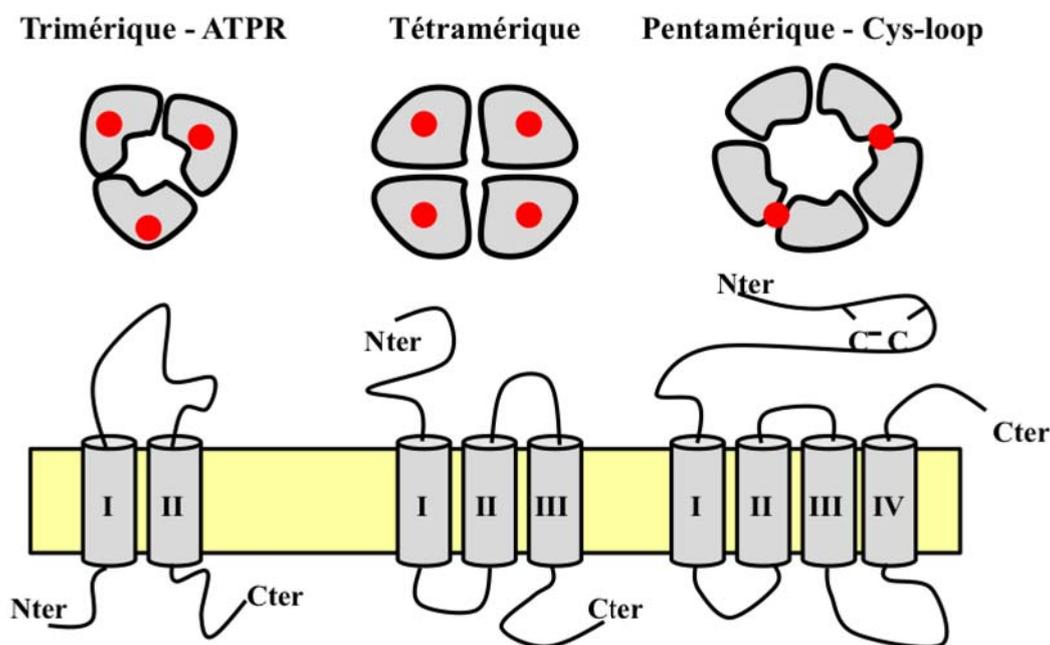


FIGURE 1.12 – Schéma simplifié des configurations structurales des trois superfamilles de récepteurs canaux à trois, quatre ou cinq sous-unités (en haut) et la composition des sous-unités correspondantes (en bas) à deux, trois ou quatre domaines transmembranaires, respectivement. Le site de fixation du ligand sur chaque type de récepteur est représenté par le cercle rouge. Modifié d'après Barbara (2007) [72].

soit identiques soit différentes entre elles; le récepteur est alors dit homomérique ou hétéromérique, respectivement pour chacun des cas. Ces différents types de récepteurs canaux sont représentés dans la Figure 1.12 (page 41). La fixation du ligand sur le site de liaison, distinct du canal ionique présent au centre du récepteur, provoque son ouverture et le passage des ions entre les deux compartiments cellulaires et assure une transmission synaptique rapide. Ce déplacement ionique peut entraîner une dépolarisation à l'origine d'un potentiel d'action, ou une hyperpolarisation de la membrane responsable d'une diminution des propriétés d'excitabilité, comme ce qui est le cas pour le GABA.

Les récepteurs de type ionotropique sont divisés en trois super-familles. Tout d'abord les récepteurs trimériques, composé de trois sous-unités possédant chacune deux domaines transmembranaires séparés par un domaine extracellulaire. Ensuite, les récepteurs tétramériques comprenant quatre sous-unités homologues composées de trois segments transmembranaires. Ces récepteurs sont cationiques (ions Ca^{2+} , K^{+}) et sensibles au glutamate. Enfin, les récepteurs pentamériques comprennent cinq sous-unités possédant chacune quatre domaines transmembranaires. Cette super-famille est également appelée « cys-loop » de par le fait que chaque sous-unité possède un pont disulfure au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire, qui constitue une liaison covalente entre les atomes de soufre des fonctions thiol de deux cystéines séparés de 13 acides aminés. Chaque sous-unité glycoprotéique membranaire comprend un long segment amino-terminal liant le ligand, et quatre segments transmembranaires nommé M1 à M4, dont le segment M2 qui est impliqué dans la formation du canal. La liaison du GABA induit l'ouverture du canal formé par les segments M2 des sous-unités assemblées qui laissent circuler les ions chlorures. Entre les segments M3 et M4 se situe une grande boucle dans le compartiment intracellulaire et qui porte les sites de phosphorylation des protéines kinases. La super-famille des cys-loop regroupe deux familles : les canaux cationiques nAChR/5HT3-like et la famille des canaux anioniques GABA/glycine-like. La composition en sous-unités des récepteurs détermine la sélectivité ionique (cations ou anions), l'affinité au ligand, la localisation subcellulaire ainsi que la

sensibilité pharmacologique.

1.6.1 Les récepteurs au GABA chez le vertébré.

Le GABA libéré au niveau de la synapse se fixe à ses récepteurs présents sur le bouton post-synaptique appartenant à différentes catégories fonctionnelles distinctes d'après les propriétés pharmacologiques des sous-unités qui les composent. Chez le vertébré et en particulier chez le mammifère, 21 sous-unités de récepteur au GABA ont été identifiées et sont codées par différents gènes, appelés : α [1 à 6]; β [1 à 3]; γ [1 à 3]; δ ; ϵ ; π [1 à 3]; θ et ρ [1 à 3]. Cette variété de sous-unités assure une grande flexibilité fonctionnelle dans le niveau et le profil de régulation de l'expression des gènes. Les récepteurs au GABA sont divisés en deux groupes suivant leur composition en sous-unités : le récepteur de type $GABA_A$ est formé de multiples combinaisons des sous-unités α , β , γ , δ , ϵ , π et θ , tandis que le type $GABA_C$ est uniquement constitué de sous-unités ρ . Ces deux récepteurs sont des récepteurs canaux ionotropiques, le type $GABA_B$ constitue le type métabotrope.

1.6.2 Les récepteurs au GABA chez l'insecte.

Les récepteurs ionotropiques des invertébrés présentent des propriétés pharmacologiques intermédiaires entre les récepteurs $GABA_A$ et $GABA_C$ des vertébrés, et ne sont donc pas divisés en groupes fonctionnels distincts [71, 73, 74]. Chez l'insecte, trois gènes codent les trois classes connues de sous-unités [73],

dont un gène prédominant et bien identifié chez la drosophile comme *rdl* (résistance à la dieldrine) qui code une sous-unité spécifique aux invertébrés, et dont des orthologues ont été découverts chez l'abeille, le moustique, la blatte et la noctuelle. La sous-unité RDL est la principale composante des récepteurs de type ionotropique et peut être exprimée de façon hétérologue pour constituer des récepteurs homo-oligomériques. Chez la drosophile cette sous-unité RDL est largement distribuée dans le système nerveux central mais est en revanche absente des tissus musculaires. Par la suite, 25 autres sous-unités ont depuis été identifiées chez la drosophile, appartenant à trois classes supplémentaires : les sous-unités LCCH3 (homologue du canal chlore couplé au ligand), phylogénétiquement proches des sous-unités β de vertébrés, sont détectées dans les somas des neurones mais pas au niveau des neuropiles synaptiques du système nerveux central chez la drosophile. La classe des GRD (récepteur au GABA et glycine de la drosophile) est proche de la sous-unité γ de vertébrés et son expression n'a pas encore été localisée. Enfin les sous-unités de type CG sont codées par 4 gènes identifiés. French-Constant et Rocheleau [75] ont démontré par l'expression hétérologue dans l'ovocyte de xénope qu'un récepteur homomérique peut être formé à partir des sous-unités RDL de drosophile mais pas à partir des sous-unités LCCH3, GRD et CG. En revanche la sous-unité LCCH3 peut former un récepteur fonctionnel en combinaison avec les sous-unités RDL et GRD et s'exprimer avant la différenciation neuronale, ce qui suggère une implication dans le développement du système nerveux.

Les récepteurs de type métabotropique sont répartis en trois types encodés par trois gènes distincts connus jusqu'à présent : les types 1 et 2 ($GABA_{BR1}$ et $GABA_{BR2}$) forment des hétérodimères, tandis que le type 3 ($GABA_{BR3}$) s'exprime de façon hétérologue seul ou avec les récepteurs $GABA_{BR1}$ ou $GABA_{BR2}$, et semble être activé majoritairement par un ligand différent du GABA [73,76]. Le GABA est abondamment retrouvé dans le cerveau des insectes, dont les abeilles [44], les drosophiles [77] et les criquets [59]. La localisation précise des ses récepteurs et les fonctions de la neurotransmission GABAergique ont été largement étudiées, l'immunoréactivité étant principalement localisée au niveau des inter-neurones locaux des lobes antennaires et dans les neurones récurrents du PCT extrinsèques innervant les corps pédonculés [44,52]. Les récepteurs, retrouvés largement au niveau des calices, le sont également et plus largement sur l'ensemble des corps pédonculés [65]. Le signal immuno-réactif étant essentiellement attribué à la sous-unité RDL, le profil de marquage suggère la présence de récepteurs au GABA sur les axones des cellules de Kenyon. Ces mêmes axones présentent également des afférences pré-synaptiques de type GABAergique identifiées dans les corps pédonculés chez le criquet [59].

Dans ce travail de thèse, les récepteurs de type ionotropique ont été bloqués par la Picrotoxine (PTX), utilisée classiquement comme antagoniste chez l'insecte [71,74], et ont été bloqués également les récepteurs de type métabotropique grâce à l'utilisation de la CGP_{54626} , connue pour être efficace chez l'in-

secte et notamment chez la drosophile [78] et l'abeille [79–81]. En étudiant les propriétés fonctionnelles des récepteurs au GABA dans des cellules de Kenyon en culture, des études [81, 82] ont démontré que ces neurones expriment des récepteurs ionotropiques dont les propriétés électro-physiologiques sont cohérentes à un rôle fonctionnel inhibiteur de la neurotransmission GABAergique, et que ce courant tonique entrant est inhibé par la Picrotoxine et d'autres antagonistes [81] mais insensible à la Bicuculline, un antagoniste utilisé chez le vertébré [71, 81, 83].

Les travaux de Dupuis et coll. [83] ont également démontré que l'application de GABA sur des cellules isolées de lobe antennaire induisait un courant rapide entrant, ce qui confirme également l'existence de récepteurs ionotropiques à la surface des lobes antennaires et suggère un rôle majeur de la neurotransmission inhibitrice dans le traitement des informations olfactives au niveau central. La majorité des études portant sur le rôle cognitif du GABA dans le cerveau de l'abeille ont consisté à injecter un antagoniste dans les lobes antennaires, un réseau complexe d'inter-neurones et de neurones de projection qui assure le premier niveau de traitement des signaux olfactifs, et constitue le premier relai nerveux. Lorsque les récepteurs au GABA sont bloqués par la Picrotoxine dans les lobes antennaires suite à un conditionnement olfactif suivi de tests de généralisation ou de discrimination, les abeilles ne sont plus capables de percevoir les mélanges odorants comme étant des stimuli configuratifs [84]. Ceci viendrait probablement du fait de la désynchronisation de l'activité de

décharge des neurones de projection normalement assurée par la neurotransmission GABAergique, ce qui pourrait être responsable de la formation de la représentation de l'indice unique pour les mélanges olfactifs complexes [78,84]. De la même façon que démontré dans d'autres études [85,86], la désynchronisation neuronale induite par un blocage de la signalisation GABAergique dans les lobes antennaires altère la discrimination d'odeurs chimiquement proches, mais pas d'odeurs très différentes [85], ce qui suggère que la synchronisation oscillatoire des assemblées neuronales semble nécessaire à l'encodage temporel des signaux. Ce traitement de l'information pourrait constituer le pré-requis aux discriminations olfactives très fines et donc représenter la qualité indispensable à la résolution de problèmes olfactifs équivoques reposant sur une ambiguïté à l'échelle des stimuli. Au sein des corps pédonculés, des centres de haut niveau d'intégration de signaux multi-sensoriels, la Picrotoxine a été récemment utilisée pour bloquer l'inhibition par le GABA dans les cellules de Kenyon, ayant pour effet d'empêcher le codage de l'information liée à la nature de l'odeur et à sa concentration dans les corps pédonculés d'abeille [80].

L'ensemble de ces travaux suggère que la signalisation par le GABA constitue un mécanisme général de la synchronisation de décharge d'assemblées de neurones permettant un encodage précis des informations olfactives à la fois au niveau des premiers (lobes antennaires) et des derniers (corps pédonculés) centres nerveux associatifs. Le codage des odeurs semble être une condition né-

cessaire et indispensable à la résolution des problèmes cognitifs olfactifs comme les formes non élémentaires d'apprentissage associatifs. Les neurones récurrents ayant été largement associés à des propriétés inhibitrices par le GABA [43,62], l'hypothèse de travail était que ces neurones récurrents constituent, au sein des corps pédonculés, la base neuronale et fonctionnelle de la neurotransmission GABAergique assurant le codage olfactif des informations ambiguës perçues lors d'un apprentissage complexe.

L'un des grands éléments permettant de soutenir cette hypothèse, préalablement à ce travail de thèse, provient d'une étude réalisée en 2007 au laboratoire par Devaud et coll. [48]. Ce travail a démontré que le blocage de l'activité des corps pédonculés par l'injection d'un anesthésiant (la Procaine) au niveau des lobes verticaux altère la résolution d'un protocole d'inversion de consigne. Ce résultat soutient l'idée, d'une part que les corps pédonculés dans leur globalité sont essentiels aux apprentissages ambigus, et d'autre part qu'une boucle de rétro-contrôle des lobes jusqu'aux calices constitue un bon candidat pour expliquer la polarité de l'effet obtenu au niveau des lobes. Cette thèse a donc eu pour point d'ancrage cette première étude générale portant sur les corps pédonculés [48], et a cherché à préciser et identifier quels en sont les circuits et les neurones qui se révèlent être spécifiquement dédiés à ce type d'apprentissage.

1.7 Les objectifs de la thèse.

L'objectif de cette thèse a été d'identifier les structures cérébrales du cerveau de l'abeille qui sont spécifiquement impliquées dans la résolution de tâches d'apprentissage présentant des ambiguïtés de complexité variée, à la fois en modalité appétitive et également en modalité aversive.

De précédentes études ont montré une implication des corps pédonculés dans l'apprentissage et la restitution de protocoles complexes [48] sur la base des données anatomiques et fonctionnelles des neurones inhibiteurs PCT innervant de façon récurrente ces structures. Ce travail a donc cherché à mettre en évidence l'implication des neurones récurrents dans la facilitation des apprentissages ambigus *via* un signal inhibiteur qui pourrait être primordial pour les discriminations complexes.

Chez l'abeille nous avons procédé dans le cadre d'un conditionnement olfactif appétitif du proboscis et aversif du dard à des blocages spécifiques de la neurotransmission GABAergique (récepteurs ionotropiques et métabotropiques) dans les corps pédonculés recevant les terminaisons axonales des neurones PCT, et couplé ces micro-injections à des conditionnements complexes d'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$) et de *feature* négatif ($A^+ AB^-$). Le but de cette démarche a été de définir le rôle de l'inhibition de l'activité des corps pédonculés exercée par la boucle PCT lors de la résolution d'une tâche cognitive au delà du simple apprentissage associatif linéaire, et d'en expliquer le mécanisme par la fine régulation des centres intégratifs du cerveau.

La comparaison des performances en modalité appétitive ou aversive a également permis d'évaluer la généralité des mécanismes étudiés, et ce quelque soit le type de renforcement employé.

La perspective ultime de ce travail reste d'évaluer la conservation au sein de différentes espèces animales d'une règle biologique générale quant à la spécialisation de certaines structures cérébrales, et dans ce cas précis en ce qui concerne des tâches cognitives de complexité variée.

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

If you eliminate the impossible, whatever remains, however improbable, must be the truth.

– Spock, *Star Trek*.

2.1 Manipulation des abeilles.

Le rucher était composé d'une quarantaine de ruches d'élevage des abeilles domestiques de l'espèce *Apis mellifera*. Ces ruches étaient ouvertes, permettant la sortie des abeilles pour les activités de butinage à la belle saison lorsque les conditions climatiques étaient propices à l'envol, soit généralement du mois d'avril au mois d'octobre. Certaines ruches, équipées d'un nourrisseur accessible par le toit, ont été placées dans un local chauffé assurant le maintien de l'activité de ponte des reines par temps froid, et évitant ainsi le déclin en hibernation de la colonie à la mauvaise saison, du mois d'octobre au mois de

mars. En dépit de l'absence de contrôle de l'âge des animaux utilisés dans les expériences, la méthode de capture employée a permis de s'assurer un approvisionnement en butineuses toute l'année, et ainsi permettre de travailler avec des abeilles issues de la même tranche d'âge. Les abeilles ont été capturées le matin de chaque jour d'expérimentation par une technicienne apicole et contenues dans des flacons en verre par groupe d'une dizaine d'individus. Afin de pouvoir être manipulées facilement et éviter le risque de piqûre, les abeilles ont été anesthésiées au laboratoire dans la glace pendant 2 à 5 minutes jusqu'à immobilisation complète. Elles ont ensuite été placées individuellement dans des tubes de contention pour conditionnement appétitif et fixées par des bandettes de scotch ne laissant que les pièces buccales et les antennes libres de mouvement [2]. Pour les expériences de conditionnement aversif, elles ont en revanche été placées sur des supports de contention horizontale, face dorsale dirigée vers le bas. Pour permettre ultérieurement la micro-injection d'agents pharmacologiques dans le cerveau, les abeilles ont été au préalable disséquées en découpant au porte-lame une fenêtre dans la cuticule céphalique entre, d'une part, la base des antennes et l'ocelle médian, et d'autre part le long de la marge des yeux composés. Le patron de dissection est représenté plus loin dans la Figure 2.4 (page 60). La pièce de cuticule a ensuite été remplacée afin d'éviter que le cerveau ne s'endommage ou se dessèche au contact de l'air, puis les abeilles ont été nourries avec 5 μ L d'eau sucrée (50% de sucrose poids/poids dans de l'eau minérale) et placées dans une chambre de repos, à l'obscurité et

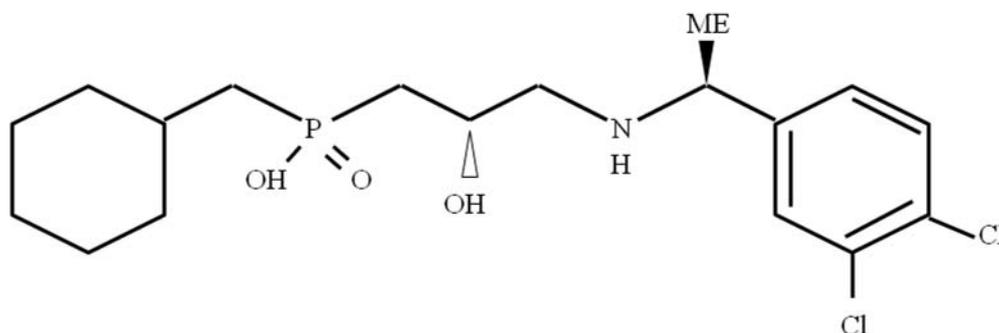


FIGURE 2.1 – Molécule de CGP_{54626} hydrochloride. D'après Sattelle, 1991 [71].

dans des conditions thermiques et hygrométriques optimales pendant 3 heures, ou pendant 2 heures avant le début des expériences appétitives ou aversives, respectivement.

2.2 Injections pharmacologiques.

2.2.1 Choix des antagonistes du GABA

Le réseau GABAergique afférent aux corps pédonculés a été bloqué chez l'abeille par l'injection d'antagonistes des récepteurs au GABA de type métabotropique et ionotropique. Dans le premier cas, la CGP_{54626} hydrochloride a été choisie (CGP_{54626} , RnD Systems France). Sa structure chimique est détaillée dans la Figure 2.1 (page 53). Parmi les autres types de CGP disponibles, dont notamment la CGP_{36216} et la CGP_{13501} qui agissent également comme modulateurs des récepteurs métabotropiques au GABA, respectivement en tant qu'inhibiteur ou activateur, la CGP_{54626} hydrochloride présentait l'avantage d'avoir déjà été utilisée efficacement chez l'insecte, et ses propriétés pharmaco-

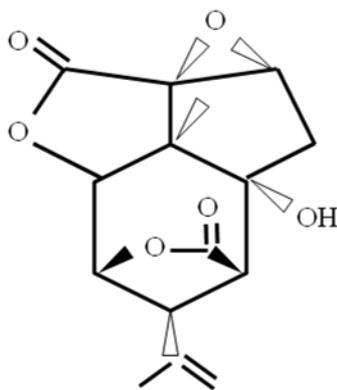


FIGURE 2.2 – Molécule de Picrotoxine. D’après Sattelle (1991) [71].

logiques sur les récepteurs métabotropiques sont bien connues concernant les cellules d’abeille [83]. Pour le blocage du second type de récepteurs, les récepteurs ionotropiques, la Picrotoxine a été choisie (PTX, Sigma-Aldrich France) et sa structure chimique est représentée dans la Figure 2.2 (page 54). D’après de précédents travaux [80], cette molécule antagonise à la fois les récepteurs canaux du GABA et également, de façon moins spécifique, les canaux chlore activés par le glutamate (récepteurs GluCl) qui sont aussi exprimés dans les cellules de Kenyon chez l’abeille [82]. Des études électro-physiologiques portées sur les neurones de vertébrés ont montré que la Picrotoxine agirait comme un antagoniste non-compétiteur d’après le déplacement des courbes de dose-réponse au GABA appliqué sur les membranes neuronales de mammifères [87].

2.2.2 Préparation et établissement des doses.

Chaque abeille injectée a reçu 0,5 nL de solution, que ce soit la solution contrôle ou encore l’une des solutions d’antagoniste. L’antagoniste du récepteur

ionotropique au GABA, la Picrotoxine, et celui du récepteur métabotropique, la CGP_{54626} , étaient présentés sous forme de poudre et ont au préalable été dissouts dans une solution tampon PBS (phosphate buffer saline) dont la composition était la suivante (en mM) : sucrose, 160 ; glucose, 25 ; HEPES, 10 ; $MgCl_2$, 4 ; NaCl, 130 ; KCl, 6 ; $CaCl_2$, 5 (pH 6,7). Ces solutions d'injection ont été refaites régulièrement, soit toutes les trois à quatre semaines, pour éviter une détérioration des propriétés des molécules actives. L'utilisation de solutions plus anciennes, préparées au-delà de cinq semaines, entraînait de façon systématique une chute massive de l'état d'activité et plus globalement des taux de survie, y compris chez les animaux injectés par la solution contrôle. Une attention particulière a donc été apportée concernant le renouvellement et l'âge des solutions d'injection employées. Les doses efficaces des deux antagonistes ont été préalablement établies.

Pour déterminer les doses d'antagonistes, des abeilles réparties en groupes indépendants ont été individuellement injectées avec l'une des différentes concentrations suivante : PBS (solution contrôle), PTX 1 μM , 10 μM ou 100 μM , CGP_{54626} 50 μM , 500 μM ou 5000 μM . Ces concentrations ont été décidées d'après une revue de la littérature concernée, en établissant la concentration intermédiaire de chaque antagoniste en fonction de la dose efficace utilisée dans de précédentes études pharmacologiques chez l'insecte [72, 78, 82–85, 88, 89]. Il a notamment été démontré que l'injection dans les lobes antennaires de PTX 100 μM abolissait le signal GABAergique inhibiteur chez l'abeille [85], le cri-

quet [88], la noctuelle [89] et la drosophile [78]. D'autre part le blocage des récepteurs métabotropiques par un bain de CGP_{54626} $500\mu\text{M}$ altérerait la réponse physiologique de cellules de Kenyon *in vivo* d'après l'étude de Froese et coll. [80].

Trois heures après l'injection bilatérale des doses-candidates dans les calices, les deux groupes d'abeilles PTX / PBS ou CGP_{54626} / PBS ont suivi un conditionnement classique différentiel en 5 essais consistant à récompenser une première odeur, le limonène (Sigma-Aldrich France, odeur A^+) et non une seconde odeur distincte, l'eugénol (Sigma-Aldrich France, odeur B^-). L'objectif de cette expérience était de déterminer quelle était la concentration minimale d'antagoniste n'altérant pas ce type d'apprentissage élémentaire, mais qui serait susceptible d'affecter par la suite un apprentissage de type ambigu. Dans le cas où une dose d'antagoniste donnée entrainerait une modification des performances d'apprentissage simple, *a priori via* des contre-performances, cette dose candidate serait exclue ultérieurement des expériences puisque dans ce cas la drogue semblerait agir au travers d'effets non spécifiques, notamment sur la région du pore de récepteurs-canaux chlore, à la glycine ou à la sérotonine [83].

Dans tous les cas, que ce soit concernant l'essai sur la Picrotoxine ou la CGP_{54626} , les abeilles contrôles ont parfaitement appris la discrimination proposée (PBS, $n = 49$ et $n = 27$, respectivement), ainsi que les abeilles injectées aux deux solutions intermédiaires (PTX $1\mu\text{M}$, $n = 26$; $10\mu\text{M}$, $n = 34$; CGP_{54626} $50\mu\text{M}$, $n = 26$; $500\mu\text{M}$, $n = 28$), bien qu'une tendance commence à

se dégager pour les doses 10 μM et 500 μM , respectivement. En revanche, les abeilles injectées à la plus forte concentration de chaque antagoniste expriment une altération massive de la capacité d'apprentissage et ne parviennent plus à résoudre la discrimination simple qui était proposée (PTX 100 μM , $n = 22$; CGP_{54626} 5000 μM , $n = 29$). Ces résultats sont présentés, pour des raisons de clarté, comme des pourcentages de réponses spécifiques lors du dernier essai de conditionnement en fonction des traitements, et sont représentés dans la Figure 2.3 (page 58). Cette réponse spécifique se définit comme étant le fait pour une abeille de répondre à l'odeur A^+ et non à l'odeur B^- lors de l'essai 5, c'est-à-dire le pourcentage d'abeilles répondant correctement au protocole. La comparaison de ces pourcentages de réponses spécifiques a été effectuée d'un point de vue statistique par le suivi d'une procédure analogue au test de Dunnett [90], comme comparaison multiple de proportions par rapport à une référence, à savoir le groupe contrôle de chaque série expérimentale [91].

Afin de trouver un bon compromis entre l'action potentielle qui est attendue en condition associative ambiguë et une absence d'effet en condition simple et non ambiguë, la dose de chaque antagoniste a donc été déterminée dans les gammes non affectées de [1-10 μM] de PTX et de [50-500 μM] de CGP_{54626} , gammes ne présentant pas d'altération de la performance, soit respectivement des solutions établies à 5 μM de PTX et 250 μM de CGP_{54626} .

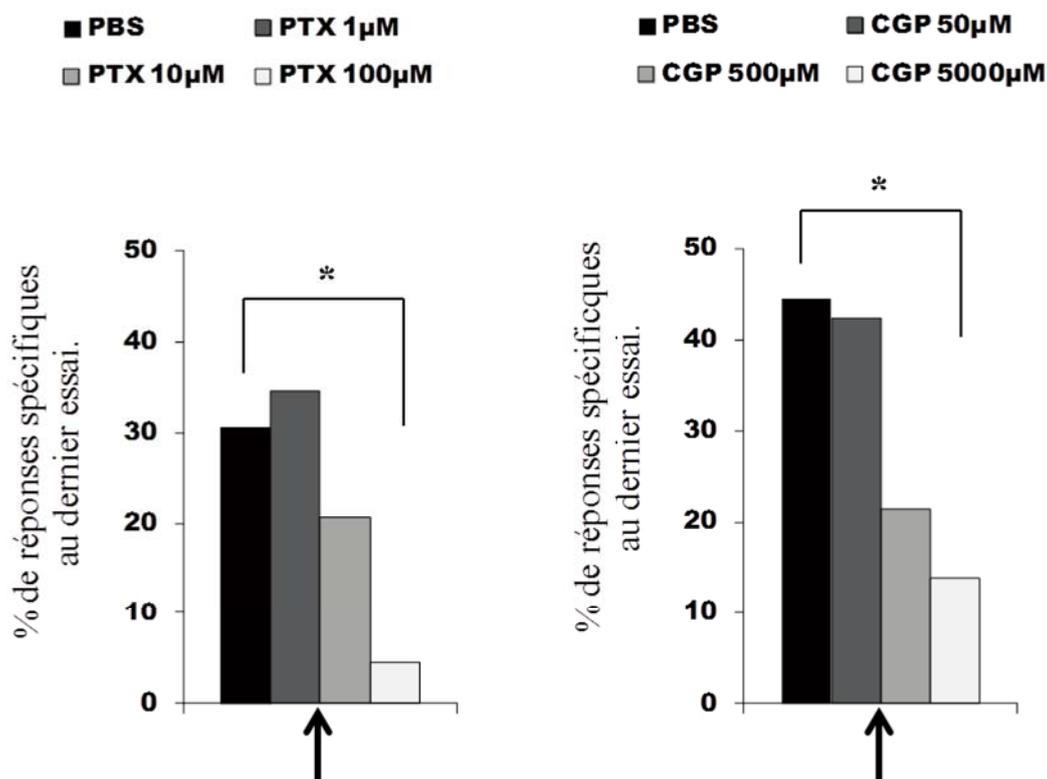


FIGURE 2.3 – Spécificité des réponses lors du dernier essai de conditionnement simple, pour les groupes injectés à la PTX (à gauche) et la CGP_{54626} (à droite) au niveau des calices des CP (PTX : $n = 49, 26, 34$ et 22 ; CGP_{54626} : $n = 27, 26, 28$ et 29). La flèche représente la gamme de concentration dans laquelle la dose efficace pour la suite des expériences a été établie. Les différences entre groupes ont été obtenues par le calcul statistique du test de Dunnett de comparaison de proportions par rapport au groupe contrôle : * $P < 0,05$.

2.2.3 Matériel opératoire et injections.

La technique d'injection dans les calices chez l'abeille est illustrée dans la vidéo disponible à l'adresse suivante : <https://youtu.be/LczcD-17i2o>. Du bleu de Méthylène (1 mM, Sigma-Aldrich France) a servi de pigment dans les solutions de PBS, PTX 5 μ M et CGP_{54626} 250 μ M afin de faciliter visuellement la préparation des capillaires et de contrôler le succès et la localisation des injections. Après avoir préparé et rempli de solution les micro-capillaires en verre (GC 100-10, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) et les avoir placés sur un micromanipulateur (WPI) connecté à système d'injection sous pression (FemtoJet express, Eppendorf, France), le volume des solutions à injecter a été déterminé en mesurant le volume éjecté par un calibrage sur une cellule de Malassez, jusqu'à l'obtention d'une gouttelette équivalent à 0,5 nL. La procédure utilisée pour les injections pharmacologiques bilatérales dans le cerveau de l'abeille a été extraite des protocoles décrits précédemment par Devaud et coll. [48] et par Boumghar et coll. [92].

Afin d'accéder facilement aux structures cibles, à savoir les calices ou les lobes des corps pédonculés, les abeilles étaient disséquées 3 heures avant l'injection selon un modèle décrit ci-après et représenté dans la Figure 2.4 (page 60). L'opération consistait à découper la cuticule de la tête à l'aide d'un porte-lame de rasoir en formant une fenêtre allant de la base des antennes aux ocelles et limitée latéralement par les yeux composés. Avant de pratiquer les injections, les sacs trachéens, les membranes et les glandes hypopharyngiennes étaient placés

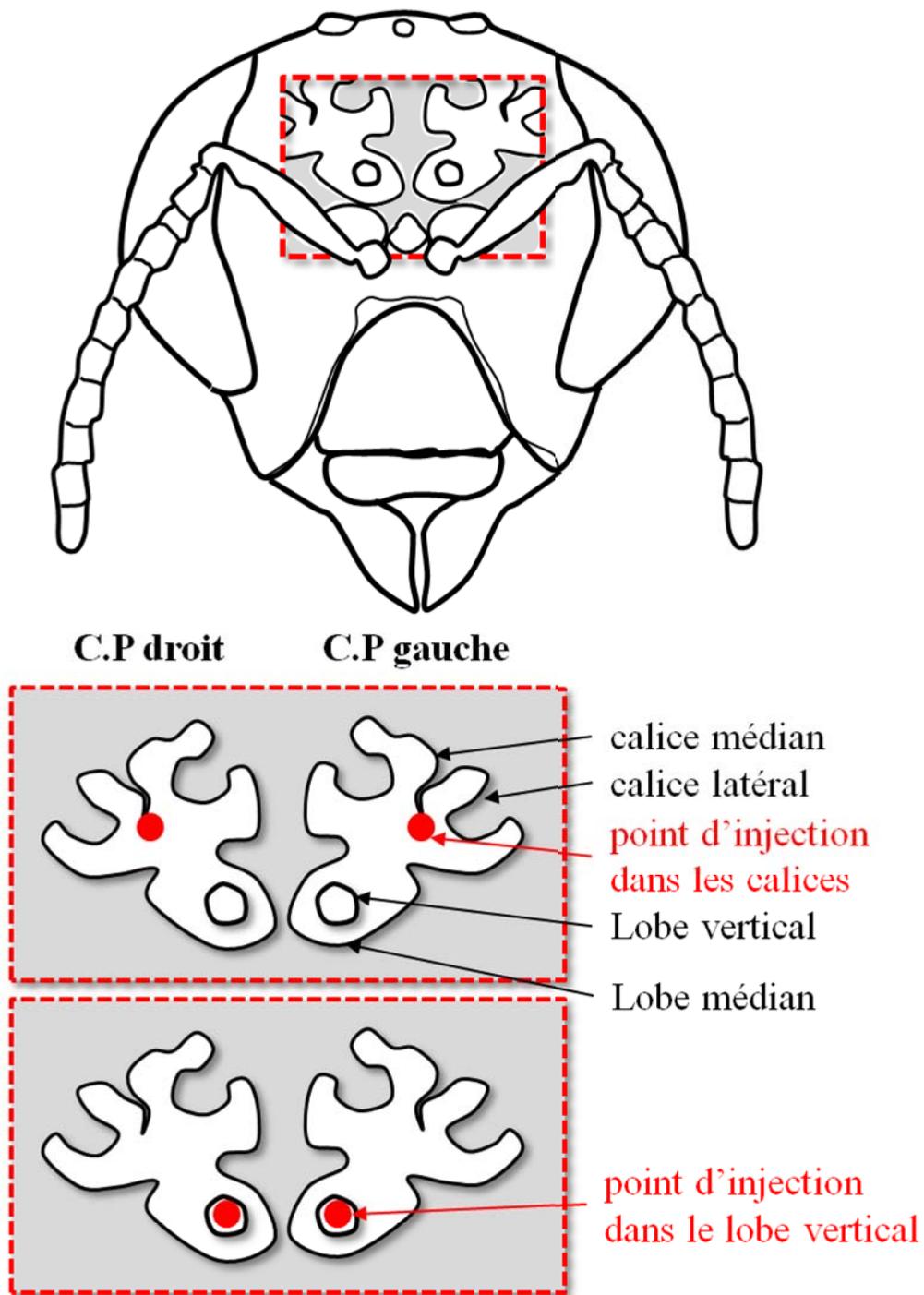


FIGURE 2.4 – Modèle de dissection de la capsule céphalique de l'abeille permettant d'accéder au cerveau et de procéder aux micro-injections pharmacologiques. Les sites d'injections dans les calices (au milieu) ou dans les lobes verticaux (en bas) en fonction de l'expérience sont représentés par des cercles rouges.

de côté puis remis en place après l'opération afin d'éviter tout dessèchement du cerveau. Les injections bilatérales ont été effectuées soit au niveau des lobes verticaux soit entre les calices médians et latéraux de chaque côté des corps pédonculés en fonction de l'expérience comportementale. Le temps d'injection était d'environ 50 secondes par abeille.

Dans l'expérience d'inversion de consigne, l'injection a été faite entre les deux phases de conditionnement, dès 30 minutes après la fin de la première phase, ce qui a laissé aux abeilles 15 minutes de repos entre l'injection et le début de la seconde phase. Dans l'expérience de *feature* négatif ne présentant pas de phases multiples, l'injection a été faite avant le début du conditionnement, les abeilles ayant également eu 15 minutes de repos afin de récupérer de la manipulation.

2.3 Expériences comportementales.

2.3.1 Préparation des odeurs.

Les odeurs utilisées pour le conditionnement olfactif ont été préparées immédiatement avant l'expérimentation, sous une hotte aspirante afin d'éviter une contamination croisée des solutions. Le limonène (Sigma-Aldrich France) a été utilisé en tant qu'odeur A, et l'eugénol (Sigma-Aldrich France) en tant qu'odeur B. En apprentissage appétitif, 4 μL d'odeur pure ont été déposés sur

une bandelette de papier Whatman (papier filtre, rétention particule 5-13 μm VWR) ou 5 μl en apprentissage aversif, selon les caractéristiques des seringues utilisées dans chacun des cas. Dans le cas du conditionnement aversif qui impliquait l'utilisation d'un mélange AB, la même quantité de chaque odeur a été déposée sur le papier, soit 5 μL de chaque odeur (10 μL au total) afin de limiter le biais de réponse spontanée observé par ailleurs en début d'expérience, et simplement attribué à une différence dans l'intensité olfactive. Afin d'éviter l'accumulation d'odeurs et de phéromones dans la pièce, le dispositif de conditionnement a été placé devant un système d'extraction d'air activé durant toute l'expérimentation. Pour les expériences contrôles nécessitant l'utilisation de deux autres odeurs, le 1-Nonanol (Sigma-Aldrich France), a été utilisé en tant qu'odeur C et le 1-Hexanol (Sigma-Aldrich France) a été utilisé en tant qu'odeur D.

2.3.2 Protocoles de conditionnement appétitif.

Les protocoles comportementaux ont été standardisés d'après les recommandations de Matsumoto et coll. [12]. Pour toutes les expériences, seules les abeilles exprimant une réponse réflexe à la présentation de sucre et toujours vivantes à l'issue du test de rétention de mémoire ont été considérées pour l'analyse. La réponse inconditionnée au sucre a été évaluée individuellement avant le conditionnement et également après le test, la séquence de conditionnement étant présentée dans la Figure 2.5 (page 64). Un soin particulier a

été apporté à l'établissement d'un enchaînement aléatoire des présentations de chaque odeur au sein des séquences, à la fois de façon intra-individuelle et inter-individuelle. Ceci afin d'éviter, d'une part, l'apprentissage par les animaux de la rythmicité de présentation du renforcement (une fois sur deux si répétition invariée de « $A^+ B^- A^+ B^-$ » par exemple) et d'autre part, un effet de facilitation ou de perturbation de séquences particulières sur l'apprentissage. En effet, la position sériée des informations à mémoriser présentées en suite à des sujets constitue un biais cognitif avéré chez le vertébré et notamment chez l'Homme [93–95], chez qui il a été démontré deux grands effets que sont la primauté et la récence, à savoir la prévalence des premiers et des derniers stimuli appris d'une série, respectivement. Cet effet de position rendant inégales les valences des associations au cours d'un conditionnement comme démontré par différentes études, la modification de la succession des séquences constitue alors dans notre travail un élément essentiel du protocole permettant d'éviter ce type de biais [93–95]. La contingence de renforcement des odeurs a également été changée entre chaque réplica expérimental pour éviter tout biais d'apprentissage basé sur la perception olfactive, l'odeur A étant tour à tour renforcée (A^+) ou non renforcée (A^-) et inversement pour l'odeur B (B^- ou B^+ , respectivement) dans le cas de l'inversion de consigne. Dans le protocole de *feature* négatif, l'odeur portant l'ambiguïté était tour à tour l'odeur A ou l'odeur B ($A^+ AB^-$ ou $B^+ AB^-$, respectivement).

Chaque séquence de conditionnement durait 40 secondes à partir du moment

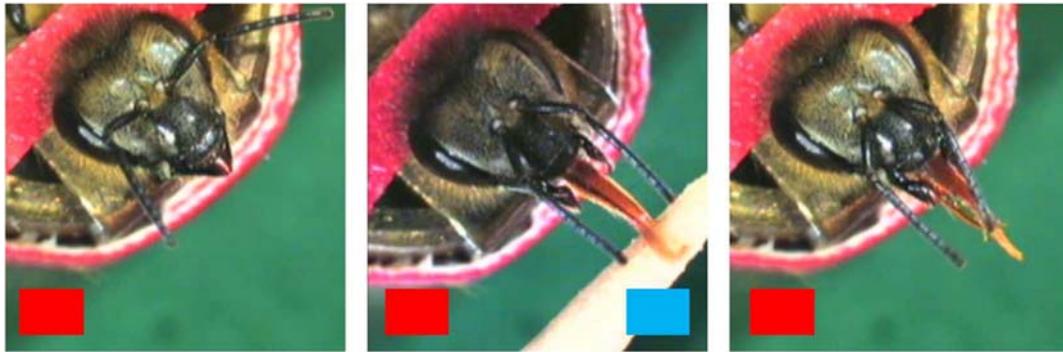


FIGURE 2.5 – Conditionnement de la réponse d’extension du proboscis d’une abeille en contention. L’odeur constituant le stimulus conditionnel, dont la présentation est symbolisée par le rectangle rouge, est initialement neutre et n’induit pas de réponse. L’association de l’odeur et de la récompense sucrée, ou stimulus inconditionnel dont la présentation est symbolisée par le rectangle bleu, engendre l’établissement d’une mémoire associative et induit une réponse conditionnée (REP) à l’odeur seule après conditionnement. Modifié d’après Matsumoto et coll. (2012) [12].

où l’abeille était disposée face au canon à odeurs envoyant un flux d’air pur et continu à 90-100 mL/min. Le canon à odeurs était contrôlé par un moniteur automatique dans lequel tous les paramètres de la séquence de conditionnement étaient préalablement rentrés. Après le placement, 15 secondes s’écoulaient jusqu’à l’envoi du stimulus olfactif soutenu pendant 4 secondes, généré par la déviation du flux d’air dans le canon à travers une seringue contenant un papier filtre imbibé de 4 μ L d’odeur pure. Afin d’induire un REP dans le cas de la présentation de l’odeur renforcée (SC^+) les antennes étaient touchées au moyen d’une pique en bois trempée dans la solution à 50% de sucre ce qui provoquait l’extension automatique du proboscis. L’abeille était ainsi autorisée à boire pendant 3 secondes, dont 1 seconde simultanée à l’odeur ce qui constituait le chevauchement SC / SI permettant l’établissement de la trace

d'association, puis pendant 2 secondes supplémentaires après la fin de l'envoi de l'odeur. Au cours de l'apprentissage, la réponse conditionnée à l'odeur seule se traduisait par l'extension franche et complète du proboscis au cours des 3 premières secondes, soit avant la stimulation par la solution sucrée. L'abeille restait sur le dispositif encore 20 secondes afin d'éviter tout apprentissage au contexte non spécifique à l'association entre odeur et sucre, puis replacée sur un portoir commun à l'issue des 40 secondes de séquence. Le test de mémoire à moyen terme était effectué une heure après la fin du conditionnement, et consistait à présenter aux abeilles les deux odeurs conditionnées de façon successive et aléatoire, sans association au renforcement. L'extension du proboscis constituait la réponse comportementale évaluée et notée en tant que réponse conditionnée, et également comme étant l'évidence d'une mémoire associative exprimée lors du test de rétention. Dans le cas du *feature* négatif nécessitant l'utilisation d'un mélange binaire d'odeurs comme SC^- , le flux d'air était envoyé simultanément à travers deux seringues, chacune contenant l'un des deux composants du mélange.

Le temps écoulé entre deux présentations successives d'odeur (ou IIE pour Intervalle Inter-Essais) a été établi à 8 minutes d'après Devaud et coll. [48], ce qui permettait d'assurer une consolidation suffisante de la mémoire d'acquisition.

Conditionnement de l'inversion de consigne.

L'inversion de consigne est un apprentissage complexe, bien que n'étant pas non élémentaire strictement parlant, qui consiste à créer une ambiguïté

temporelle de par une première phase qui propose un conditionnement différentiel classique $[A^+ B^-]$ suivie d'une seconde phase inverse $[A^- B^+]$ selon une séquence détaillée dans la Figure 2.6 (page 67). Il est à noter que seules les abeilles considérées comme apprenantes ont été ensuite injectées. Le critère de réussite d'une phase de conditionnement a été établi comme étant composé d'un nombre de réponse pour le SC^+ strictement supérieur à celui pour le SC^- , c'est-à-dire pour la première phase, un nombre de réponses à A^+ strictement supérieur à celui à B^- ($RC_{A^+} > RC_{B^-}$, [96,97]). Les abeilles non apprenantes ($RC_{A^+} \leq RC_{B^-}$) étaient écartées de la série expérimentale dans l'ensemble du travail. Ces individus, très minoritaires, ne constituaient en moyenne que 2% à 5% de l'ensemble des effectifs. Cette sélection des abeilles se justifie par le fait que l'étude de l'inversion de consigne n'a de sens que dans le cas d'un apprentissage effectif de la première phase, puisque les individus n'ayant pas appris cette première phase ne pourront vraisemblablement pas se rappeler de l'odeur récompensée et donc renverser le sens de leurs réponses ultérieurement [98]. Maintenir ce type d'animaux dans la série expérimentale serait alors susceptible d'altérer les résultats et leur interprétation [98,99]. La valence des renforcements apprise dans un premier temps doit alors être inversée par la suite, ce qui implique une réécriture totale de la trace mnésique associée aux odeurs A et B. Après le conditionnement de la première phase (pour rappel, odeur A : limonène ; odeur B : eugénol), les abeilles ayant fait la preuve d'un apprentissage effectif ont bénéficié d'une heure de repos permettant la conso-

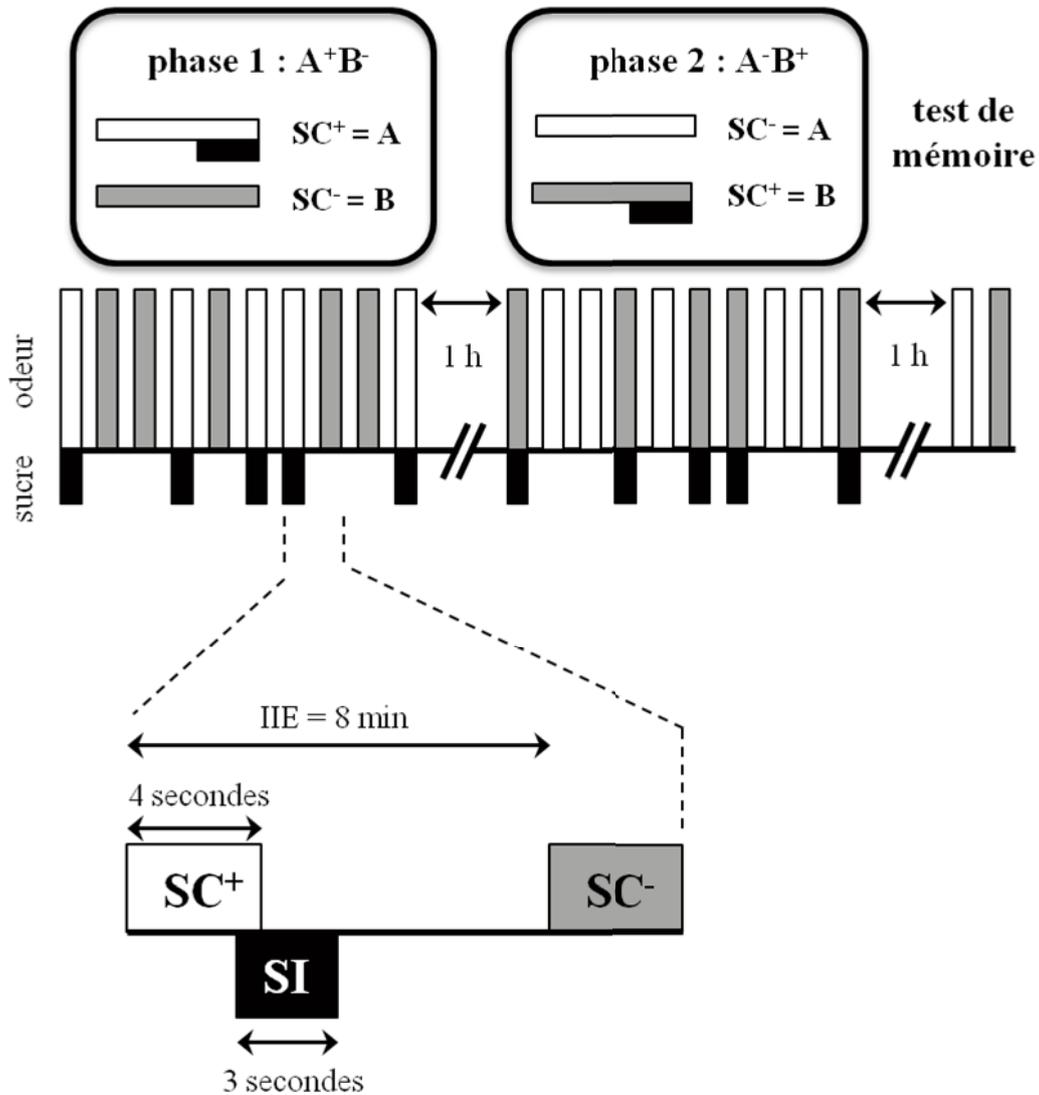


FIGURE 2.6 – Séquence temporelle de conditionnement de l'inversion de consigne, montrant l'alternance des 5 présentations du stimulus conditionnel renforcé (associé au sucre, en noir) et des 5 présentations du stimulus non renforcé. Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. La séquence d'un essai est détaillée dans la partie du bas, et comprend après la familiarisation la présentation conjointe SC^+ et SI ou SC^- seul. Modifié d'après Matsumoto et coll. (2012) [12].

lisation de l'acquisition de la première phase. Au bout de 45 minutes, une partie des abeilles a été injectée à la solution contrôle (PBS) et l'autre partie à l'antagoniste candidat (PTX ou CGP_{54626}), dégageant à l'issue des injections 10 à 15 minutes de repos supplémentaires avant le début de la seconde phase, au cours de laquelle trois protocoles distincts ont été utilisés.

1) Premièrement, afin d'évaluer l'effet des antagonistes sur la capacité de résoudre un apprentissage associatif ambigu, les mêmes odeurs A et B ont été présentées selon des contingences inverses de renforcement [seconde phase : $A^- B^+$] ce qui constitue un protocole classique d'inversion de consigne [98].

2) Deuxièmement, pour vérifier que l'apprentissage simple et non ambigu reste intact même chez les abeilles injectées avec des antagonistes, l'ambiguïté du protocole a été levée par la simple utilisation de nouvelles odeurs en seconde phase : l'odeur A a ainsi été remplacée par l'odeur C (1-heptanal, Sigma-Aldrich France) et l'odeur B a été remplacée par l'odeur D (1-nonanol, Sigma-Aldrich France). Les deux phases constituent alors deux apprentissages différentiels simples et indépendants [seconde phase : $C^+ D^-$]. Cette expérience permet d'attribuer une possible altération des performances au cours de l'inversion de consigne classique (protocole ci-dessus) à un effet spécifique des antagonistes sur l'apprentissage ambigu et non pas sur l'apprentissage purement élémentaire. Dans le cas où les abeilles injectées par les antagonistes exprimeraient des performances réduites lors de la seconde phase $C^+ D^-$, ceci pourrait suggérer un effet indésirable de la PTX ou de la CGP_{54626} sur les

mécanismes de base de l'olfaction en terme de perception, de traitement sensoriel, de consolidation ou de mémorisation. Il apparait donc crucial à cette étape que les groupes PTX / PBS et CGP_{54626} / PBS présentent des taux d'apprentissage statistiquement identiques afin d'écarter cette hypothèse.

3) Troisièmement, afin de comprendre quelles sont les composantes du paradigme qui seraient potentiellement affectées par les antagonistes, les odeurs A et B ont été présentées mais sans aucun renforcement [seconde phase : $A^- B^-$] ce qui constitue une phase d'extinction de la mémoire précédemment acquise. L'objectif de cette expérience a été de déterminer si l'effet potentiellement observé lors de l'inversion de consigne pouvait être du à un déficit de la capacité d'extinction de la réponse à l'odeur A, ce qui dans ce cas expliquerait l'impossibilité des abeilles à inverser leurs réponses, puisqu'elles seraient incapables de réduire suffisamment la réponse à A au bénéfice de B, et ainsi atteindre un point d'inversion.

Pour ces trois protocoles expérimentaux chaque phase était composée de 5 présentations du SC^+ et de 5 présentations du SC^- , soit de 10 essais de conditionnement au total.

Conditionnement du *feature* négatif.

Ce second protocole d'apprentissage ne consiste de nouveau pas à proposer des relations de causalité strictement non élémentaires, puisqu'il repose sur une ambiguïté olfactive dite configurale, la résolution du problème proposé pouvant impliquer d'une part une stratégie linéaire simple ou encore une stratégie non

élémentaire par la prise en compte du contexte sensoriel du stimulus. Dans ce protocole l'odeur A seule est renforcée par l'association du sucre, tandis que le mélange binaire de A avec une autre odeur bien distincte, l'odeur B, n'est pas renforcé ($A^+ AB^-$). Cette séquence de conditionnement est détaillée dans la Figure 2.7 (page 71). L'association de l'odeur A avec la récompense alimentaire est dans ce cas équivoque, puisque dans la moitié de cas de présentations, A est renforcée (cas de l'odeur seule) et dans l'autre moitié elle n'est pas renforcée (cas de l'odeur au sein du mélange). Trois heures après avoir disséquées, une partie des abeilles a été injectée à la solution contrôle (PBS) et l'autre partie à l'antagoniste candidat (PTX) ce qui a laissé 10 à 15 minutes de repos avant le début du conditionnement, au cours duquel trois protocoles ont été utilisés.

1) Premièrement, afin d'évaluer l'effet de l'antagoniste sur la capacité de résoudre un apprentissage ambigu, les abeilles ont été sujettes à un conditionnement de *feature* négatif classique ($A^+ AB^-$) en récompensant le limonène (odeur A) mais non le mélange (AB).

2) Deuxièmement, pour vérifier que l'apprentissage simple et non ambigu reste intact même chez les abeilles injectées avec l'antagoniste, l'ambiguïté configurale du protocole a été retirée en remplaçant l'odeur A par une troisième odeur distincte C (1-nonanol) dans le mélange. La discrimination ainsi générée redevient alors élémentaire car l'odeur seule et les composantes du mélange binaires n'entretiennent plus de lien équivoque ($A^+ BC^-$). Dans le cas où un

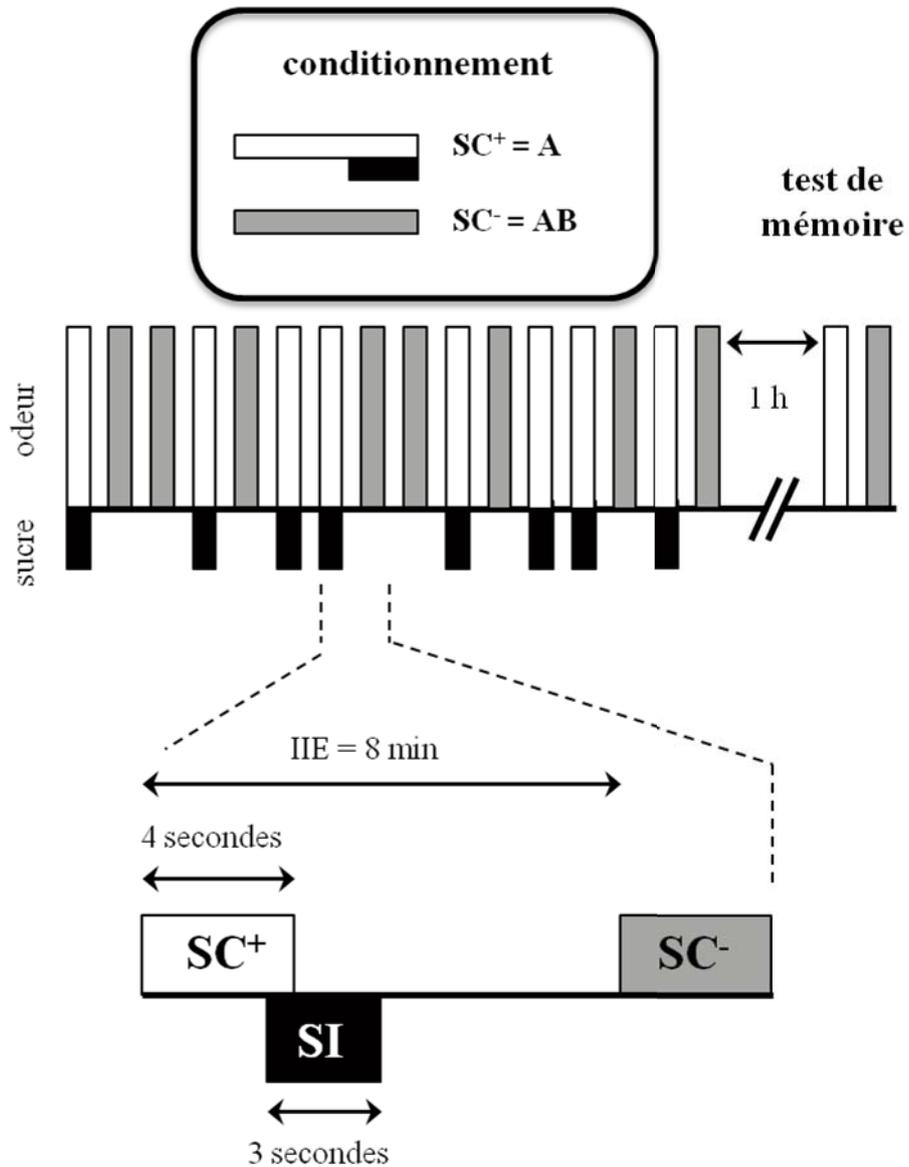


FIGURE 2.7 – Séquence temporelle de conditionnement appétitif du *feature* négatif, montrant l’alternance des 8 présentations de l’odeur seule renforcée (en blanc) et des 8 présentations du mélange non renforcé (en gris). Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. Modifié d’après Matsumoto et coll. (2012) [12].

effet de l'antagoniste serait observé au cours du conditionnement précédent de *feature* négatif (protocole ci-dessus), ce second protocole permettrait de déterminer si cet impact était spécifique à l'apprentissage ambigu ou non, et donc potentiellement invalider l'hypothèse d'un effet indésirable de l'antagoniste notamment sur les capacités olfactives.

Pour ces deux protocoles, chaque phase était composée de 8 présentations du SC^+ et 8 présentations du SC^- donc 16 essais de conditionnement au total.

3) Troisièmement, au cours d'une nouvelle expérience de conditionnement de *feature* négatif classique ($A^+ AB^-$), deux blocs supplémentaires ont été ajoutés afin de rallonger la durée d'apprentissage et ainsi s'assurer qu'une absence de discrimination chez le groupe injecté à l'antagoniste (premier protocole) ne serait pas due à un retard d'acquisition, mais bien à une absence complète de capacité d'apprentissage (10 présentations du SC^+ et 10 présentations du SC^- donc 20 essais de conditionnement au total).

2.3.3 Protocole de conditionnement aversif.

L'abeille constitue un excellent modèle d'étude de l'apprentissage appétitif depuis près d'un siècle de par sa capacité à associer différentes informations sensorielles à une récompense alimentaire sucrée. Néanmoins, l'exploration des capacités cognitives en modalité aversive ne représente qu'un volet récent des travaux menés chez cet insecte, le premier protocole ayant été traité par Vergoz et coll. [9] en 2007 permettant le conditionnement du réflexe d'extension du

dard (RED) par l'association d'odeurs à des chocs électriques et l'accès aux bases neuronales sous-jacentes. Chez la drosophile en revanche, l'autre grand modèle insecte pour l'étude de l'apprentissage et de la mémoire, l'apprentissage aversif constitue la trame dominante des travaux [32, 100–102]. La comparaison de l'apprentissage appétitif chez l'abeille et aversif chez la drosophile s'est avérée jusqu'alors très délicate, du fait de la divergence des contextes de comportement, de motivation ainsi que de la nature et la valeur subjective du stimulus inconditionnel employé. Afin d'évaluer les mécanismes sous-tendant l'apprentissage et la mémoire chez ces deux modèles, la modalité aversive chez l'abeille a été établie dans les travaux de Vergoz et coll. [9], repris ensuite par Tejakumala et Giurfa [10] qui ont permis le développement des conditions expérimentales chez des abeilles en contention sujettes à des stimulations aversives et nocives. Ces études ont également démontré que ces animaux sont capables de maîtriser simultanément des associations à la fois appétitives et aversives, modulées au niveau central par une neurotransmission octopaminergique et dopaminergique, respectivement [9]. Alors que de nombreux types d'apprentissage de complexité variée ont été largement abordés en modalité appétitive, les associations entre odeur et choc électrique n'ont été étudiées que sous un aspect élémentaire par des contingences simples et linéaires, à savoir le conditionnement absolu (A^+) et différentiel ($A^+ B^-$) uniquement [9, 10].

Le protocole aversif de *feature* négatif a été mis au point et amélioré dans cette présente thèse avec l'aide précieuse de Hélène Gauchez, étudiante dans le

cadre de son stage de première année de Master BioSanté à l'Université Paul Sabatier.

Pour toutes les expériences, seules les abeilles exprimant une réponse spontanée et réflexe à l'application d'un léger choc électrique, et également toujours vivantes à l'issue du test de rétention de mémoire, ont été considérées pour l'analyse. La conductivité entre les 2 plaques métalliques du support était assurée par l'ajout préalable d'un gel de conduction (Sigma gel 250g, Parker Laboratories, Etats-Unis) dont les propriétés conductrices ont été augmentées par une dilution à 50% dans de l'eau distillée, d'après les observations de précédents étudiants au laboratoire. Dès la fixation des abeilles et tout au long de l'expérience, la pièce a été maintenue à 25°C et les abeilles n'ayant pas été nourries ont été écartées de la série expérimentale car la quantité de nourriture dans le jabot est susceptible d'influencer la conduction du courant. La réponse inconditionnée au choc a été évaluée individuellement avant le conditionnement et également après le test. De la même façon qu'en apprentissage appétitif, l'enchaînement des présentations de chaque odeur était aléatoire au sein des séquences intra- et inter- individuelles de conditionnement, afin d'éviter d'une part l'apprentissage de la rythmicité du renforcement et d'autre part, un effet de position sériée comme décrit précédemment. Il a notamment été observé que la présentation de l'odeur SC^+ en premier lieu induisant un fort taux de réponse lors de la présentation de SC^- par la suite, phénomène non observé lorsque l'ordre de présentation était inversé et qui s'explique, en dehors

d'un apprentissage, par le rappel du choc perçu indépendamment de l'indice olfactif et à l'évidence d'un effet de primauté [93–95]. La contingence de renforcement des odeurs a également été changée entre chaque réplica expérimental pour éviter tout biais olfactif, dans le cas du conditionnement de *feature* négatif, l'odeur renforcée étant tour à tour l'odeur A ($A^+ AB^-$) ou l'odeur B ($B^+ AB^-$). Chaque abeille a suivi une séquence de conditionnement constituée d'une succession semi-aléatoire de 9 essais de A^+ (ou B^+) associés à un choc électrique de 5,5 volts, et de 9 essais du mélange AB^- non renforcé. Le nombre d'essais (9) a été établi en se basant sur le nombre d'essais minimal requis classiquement en modalité appétitive (8), et suite à des expériences préliminaires qui ont permis de constater que la performance obtenue à l'issue de ces 8 essais semblait insuffisante. L'ajout d'un bloc d'essais supplémentaire s'est donc révélé être un bon compromis pour l'obtention de taux d'acquisition et de mémoire corrects, en particulier sachant que les futures étapes d'injections sont susceptibles d'atténuer les performances. Le voltage considéré, inférieur de 2 volts à ceux employés classiquement par les études précédentes [9,10] est celui ayant permis d'obtenir les meilleurs résultats. En effet, un voltage plus élevé (soit 7,5 V) altérait visiblement l'état et le niveau de réponse des abeilles en fin de conditionnement, tandis qu'un voltage plus bas (soit 4 V) n'aboutissait pas à un bon niveau de discrimination, probablement du fait d'une faible valence du renforcement. Néanmoins les valeurs subjectives intrinsèques de ces deux voltages (5,5 et 7,5 V) semblent équivalentes au vu d'un niveau de réponse

innée identique pour ces deux intensités chez des abeilles soumises à une série de chocs électriques d'intensités croissantes [10].

Contrairement à l'apprentissage appétitif et pour des raisons de praticité technique, le conditionnement aversif était effectué manuellement, c'est-à-dire sans canon à odeurs, les papiers imbibés d'odeurs étant placés directement dans une seringue pour présentation manuelle. Les transitions entre les différentes phases étaient cependant réalisées avec l'aide de signaux sonores émis par un moniteur. Chaque séquence de conditionnement, représentée dans la Figure 2.8 (page 77) durait 50 secondes à partir du moment où l'abeille était disposée sur le dispositif. Après le placement, 20 secondes s'écoulaient jusqu'à l'envoi manuel du stimulus olfactif soutenu pendant 5 secondes, généré en poussant régulièrement le piston d'une seringue 50 mL contenant un papier filtre imbibé de 5 μL d'odeur pure ou de 10 μL dans le cas du mélange [103]. Afin d'induire un RED dans le cas de la présentation de l'odeur renforcée (SC^+), le choc était envoyé par un générateur électrique (60 Hz - courant AC), 3 secondes après le début de la présentation de l'odeur et pendant 2 secondes de chevauchement SC / SI permettant à l'animal d'établir l'association. La stimulation à la fois olfactive et électrique cessait de façon simultanée, puisque le prolongement du stimulus nocif après l'arrêt du signal olfactif ne constitue pas un élément facilitateur dans ce type d'apprentissage [9]. La réponse conditionnée à l'odeur seule se traduisait par l'extension du dard au cours des 3 premières secondes, soit avant la stimulation par le choc, ce qui traduisait l'anticipation du ren-

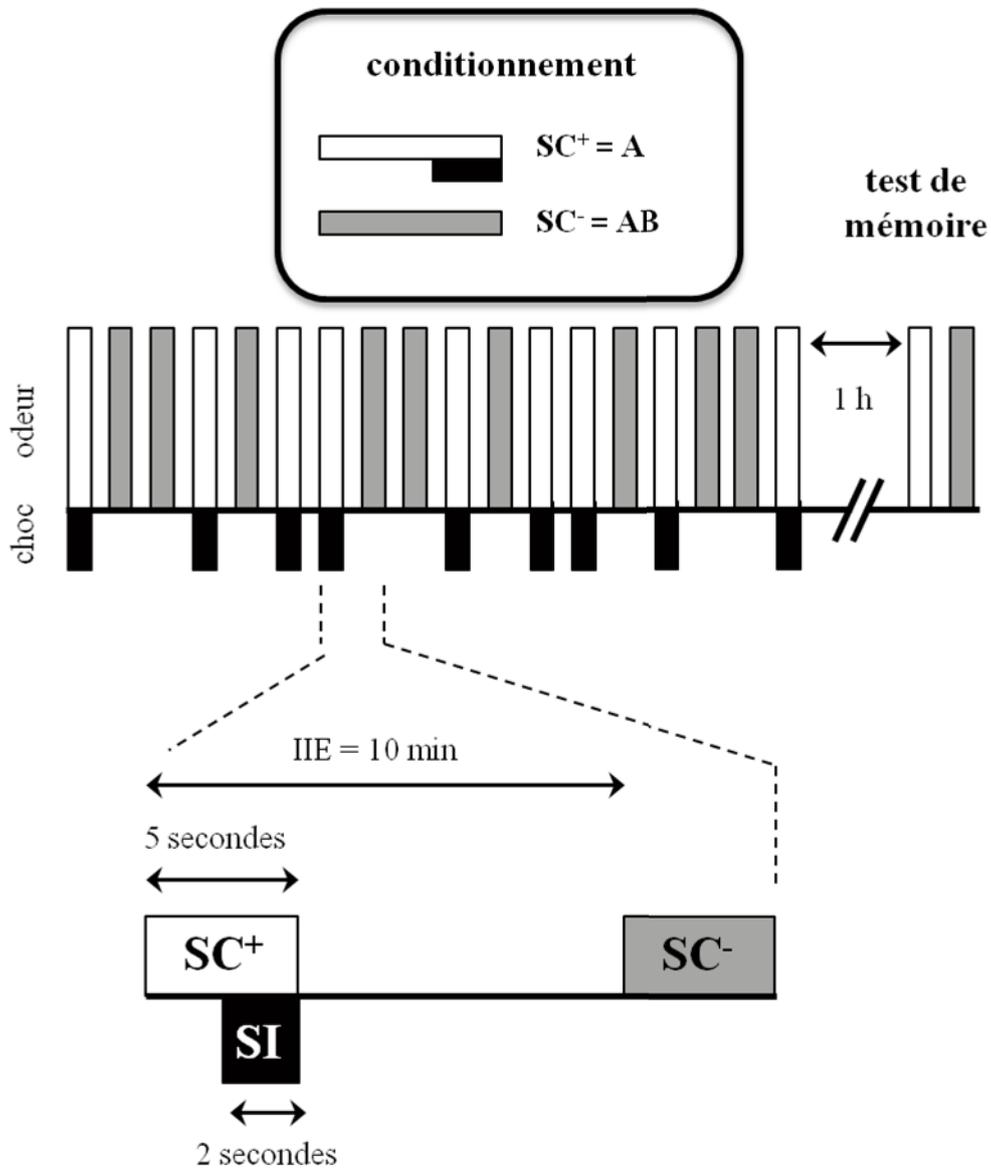


FIGURE 2.8 – Séquence temporelle de conditionnement aversif de *feature* négatif, montrant l’alternance des 9 présentations de l’odeur seule (en blanc) renforcée par le choc électrique (en noir) et des 9 présentations du mélange non renforcé (en gris). Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. Modifié d’après Matsumoto et coll. (2012) [12].

forcement aversif associé. L'abeille restait sur le dispositif encore 20 secondes afin d'éviter tout apprentissage au contexte non spécifique à l'association, puis replacée sur un portoir commun contenant les 12 abeilles de chaque groupe expérimental, à l'issue des 50 secondes de séquence. L'intervalle inter-essais a été établi à 10 minutes, permettant une consolidation suffisante de la mémoire d'acquisition. Le test de mémoire était effectué une heure après la fin du conditionnement, et consistait à présenter selon un ordre aléatoire chaque odeur sans renforcement.

2.4 Analyse statistique des données et rédaction.

Afin de renforcer la fiabilité des tests statistiques menés sur les résultats, toutes les expériences ont été réalisées sur un nombre relativement élevé d'individus (soit $n > 40$), et toujours identique entre le groupe traité par l'antagoniste et son groupe contrôle correspondant, pour chaque expérience. Tous les résultats présentés sont des représentations du pourcentage de réponse populationnelle de l'échantillon et correspondent aux pourcentages d'animaux sur l'ensemble du groupe expérimental présentant une réponse d'extension de l'organe cible (proboscis ou dard) apprise en réponse à l'odeur conditionnée. Ce type de résultats est compatible avec les conditions requises pour appliquer une analyse de la variance (ANOVA) sur des données binaires dépendantes [104].

Une ANOVA à mesures répétées a donc été utilisée pour comparer les pourcentages de réponses entre groupes et au sein des groupes d'après les facteurs odeur ou essai au cours du conditionnement, ainsi que pendant le test de mémoire à une heure. Un test *a posteriori* de Tukey a également été utilisé après l'analyse de la variance pour déterminer plus précisément les différences obtenues par ANOVA. Toutes les analyses statistiques ont été faites à l'aide du logiciel Statistica en version 7.1 (StatSoft France 2006). D'autre part ce présent manuscrit a été rédigé sous MacTeX-2014.

Chapitre 3

Apprentissage de l’Inversion de Consigne

Some people can read War and Peace and come away thinking it’s a simple adventure story. Others can read the ingredients on a chewing gum wrapper and unlock the secrets of the universe.

– Lex Luthor, *Superman*.

L’inversion de consigne (ou *reversal learning* en Anglais) est un protocole d’apprentissage ambigu, qui présente lors d’une première phase deux stimuli A et B renforcés de façon différentielle classique ($A^+ B^-$), puis les valences associatives sont respectivement inversées au cours d’une seconde phase de conditionnement ($A^- B^+$), le protocole complet se traduisant comme $A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$ [98, 105–109]. Il est également possible d’obtenir de bonnes performances chez des abeilles soumises à des phases multiples de réversion ($A^+ B^-$

$\rightarrow A^- B^+ \rightarrow A^+ B^- \rightarrow A^- B^+ \rightarrow A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$) [98].

Dans le cas du protocole classique présentant deux phases uniquement, la transition entre $A^+ B^-$ et $A^- B^+$ constitue alors une ambiguïté à résoudre pour l'animal, puisque les associations apprises précédemment ne sont plus valables lors de la seconde phase, ce qui implique la nécessité de réacquérir ce qui a été établi [48, 61, 110] et adapter la réponse comportementale à la nouvelle règle. Le nouvel appariement du SC^+ - anciennement neutre - avec le renforcement génère alors un apprentissage de type excitateur, tandis que l'extinction provoquée sur le SC^- - anciennement renforcé - génère un apprentissage inhibiteur en relation à la nouvelle consigne de contingence [106]. L'animal doit ainsi apprendre à activer sa réponse au nouveau SC^+ , tandis qu'il doit apprendre à inhiber sa réponse au SC^- . L'inversion de consigne constitue de ce fait un protocole qui se révèle plus complexe qu'une simple discrimination différentielle, impliquant à la fois de l'acquisition excitatrice et de l'extinction, puisque l'animal doit ici opérer ces associations dans le cadre de contingences inversées [106–108]. D'un point de vue théorique, l'ambiguïté peut être simplement résolue en traitant chaque phase comme deux tâches élémentaires et indépendantes ($A^+ B^- / A^- B^+$), mais admet également une résolution de type non élémentaire si l'animal prend en compte la dynamique temporelle des contingences d'associations ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$) ce qui implique nécessairement de considérer l'entière du problème en terme de liens associatifs dépendants du temps. Traiter l'ambiguïté temporelle de cette façon serait potentiellement

plus coûteux d'un point de vue cognitif, car il serait supposé mettre en jeu des mécanismes au-delà du traitement d'associations linéaires simples.

3.1 Rôle général des corps pédonculés dans l'apprentissage de l'inversion de consigne.

Avant d'étudier plus finement les circuits neuronaux impliqués dans l'inversion de consigne comme premier cas d'apprentissage ambigu, la première étape du travail a été de reproduire les observations de Devaud et coll. [48] qui ont démontré que l'activité neuronale générée par des corps pédonculés (CP) intacts était requise pour l'acquisition de l'inversion de consigne chez l'abeille, mais pas au cours d'un apprentissage différentiel classique. Cet argument est soutenu par des expériences d'injections d'un anesthésiant, la Procaïne, dans les lobes verticaux constituant la zone d'efférence neuronale des CP [48]. Ce blocage spécifique de la capacité des CP à transmettre des informations aux autres structures nerveuses et notamment à des motoneurones extrinsèques a été directement corrélé par les auteurs à l'absence d'apprentissage ambigu d'inversion de consigne, indépendamment de tout effet sur l'apprentissage non ambigu [48]. Ceci traduit le rôle global des CP dans ce processus, à savoir comme étant des aires cérébrales impliquées comme centres actifs de l'apprentissage et de la mémoire associative, mais ne permet pas d'identifier quelles en sont les composantes ni les circuits neuronaux spécifiquement impliqués.

L'identification de ces réseaux a été l'objet du présent travail, mais a, au préalable, nécessité de confirmer le rôle général des CP dans ce mécanisme.

Pour cela, le protocole utilisé par Devaud et coll. [48] a été répliqué, en injectant soit du PBS comme solution contrôle ($n = 36$) soit de la Procaïne comme anesthésiant (740 mM dilué dans du PBS, $n = 36$) dans les lobes verticaux, bilatéralement de chaque côté des CP entre les deux phases de conditionnement de l'inversion de consigne. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.1 (page 87). Comme dans toutes les expériences d'inversion de consigne suivantes, les abeilles ont été entraînées à discriminer 5 présentations de l'odeur A récompensée (le limonène) de 5 présentations de l'odeur B non récompensée (l'eugénol) au cours de la première phase ($A^+ B^-$), et ce 3 heures après avoir été disséquées.

A la fin des 10 présentations aléatoires, la grande majorité des abeilles de chaque groupe expérimental ont été capables d'apprendre la discrimination, puisque le taux de réponse à A^+ est significativement plus élevé que celui à B^- dès le second essai de conditionnement d'après l'analyse globale de variance (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,35} = 210,49$ pour le groupe PBS et $F_{1,35} = 304,20$ pour le groupe Procaïne ; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5 pour les deux groupes). L'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,35} = 39,49$; Procaïne : $F_{4,35} = 56,02$; $P < 0,001$) ce qui indique que les courbes de réponses à A^+ et B^- suivent des dynamiques

différentes dans les deux cas, ce qui s'observe aisément puisque les abeilles augmentent nettement leur réponse à l'odeur renforcée tandis qu'elles maintiennent celle à l'odeur non renforcée à un faible niveau. Un autre élément essentiel qui se dégage de l'étude de cette première phase de conditionnement, et indispensable à la suite de l'expérience, concerne la similarité d'acquisition entre les deux groupes avant l'étape d'injection. En effet, les abeilles conditionnées et qui seront ensuite réparties en deux groupes d'injection doivent présenter des performances et des dynamiques d'acquisition identiques, afin d'exclure un biais dans l'acquisition de première phase lors de l'interprétation des résultats d'inversion de consigne, et s'assurer comme ici que les deux groupes ne montrent pas de différence à ce stade *a priori* avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,69} = 0,56$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,66} = 0,97$; $P > 0,05$). La différence entre les deux groupes obtenue au cours du conditionnement de la seconde phase peut de ce fait être spécifiquement attribuée au traitement, et *a priori* à aucun autre facteur. Cette observation est valable pour toutes les autres expériences, mais la similarité des deux groupes en première phase a néanmoins été systématiquement évaluée afin de s'assurer de l'absence de biais antérieur à l'injection. La performance d'acquisition, également obtenue de façon systématique entre le groupe conditionné sur $A^+ B^-$ et celui conditionnée sur $A^- B^+$ comme pour la suite de toutes les expériences, révèle la capacité bien connue des abeilles à discriminer deux odeurs après un conditionnement même relativement court.

Les abeilles considérées comme apprenantes, c'est-à-dire présentant un taux de réponse à A strictement supérieur à celui pour B sur l'ensemble de la première phase ($RC_{A+} > RC_{B-}$) ont été ensuite injectées soit à la solution contrôle (PBS) soit à l'anesthésiant (la Procaine) au niveau des lobes verticaux. Un soin particulier a été apporté afin d'éviter un biais d'apprentissage entre les groupes destinés à être injectés au PBS ou à la Procaine, et ceci est également valable pour toutes les autres expériences. La répartition des abeilles dans chacun des groupes était donc faite de manière aléatoire pour obtenir des populations homogènes et similaires en terme de dynamique d'apprentissage, concernant le nombre d'essais nécessaire avant d'observer une discrimination, la présence ou l'absence de réponse au dernier essai, ainsi que l'état général de l'animal. Après avoir été injectées et avoir disposé de 15 minutes de repos, les abeilles étaient conditionnées au cours d'une seconde phase inverse de la première ($A^- B^+$).

Alors que les abeilles contrôles ont été capables d'apprendre et inverser leurs réponses entre A et B d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, interaction odeur x essais : $F_{4,35} = 17,60$; $P < 0,001$) et le test post-hoc de Tukey appliqué pour la différence de réponse entre A et B lors du dernier essai ($P = 0,009$), celles injectées à la Procaine ont été incapables d'acquérir la règle inverse et ont répondu de façon similaire aux deux odeurs au dernier essai (interaction odeur x essais : $F_{4,35} = 7,34$; $P < 0,001$; test post-hoc de Tukey : $P > 0,05$ à l'essai 5). Deux points importants sont à préciser en comparant le

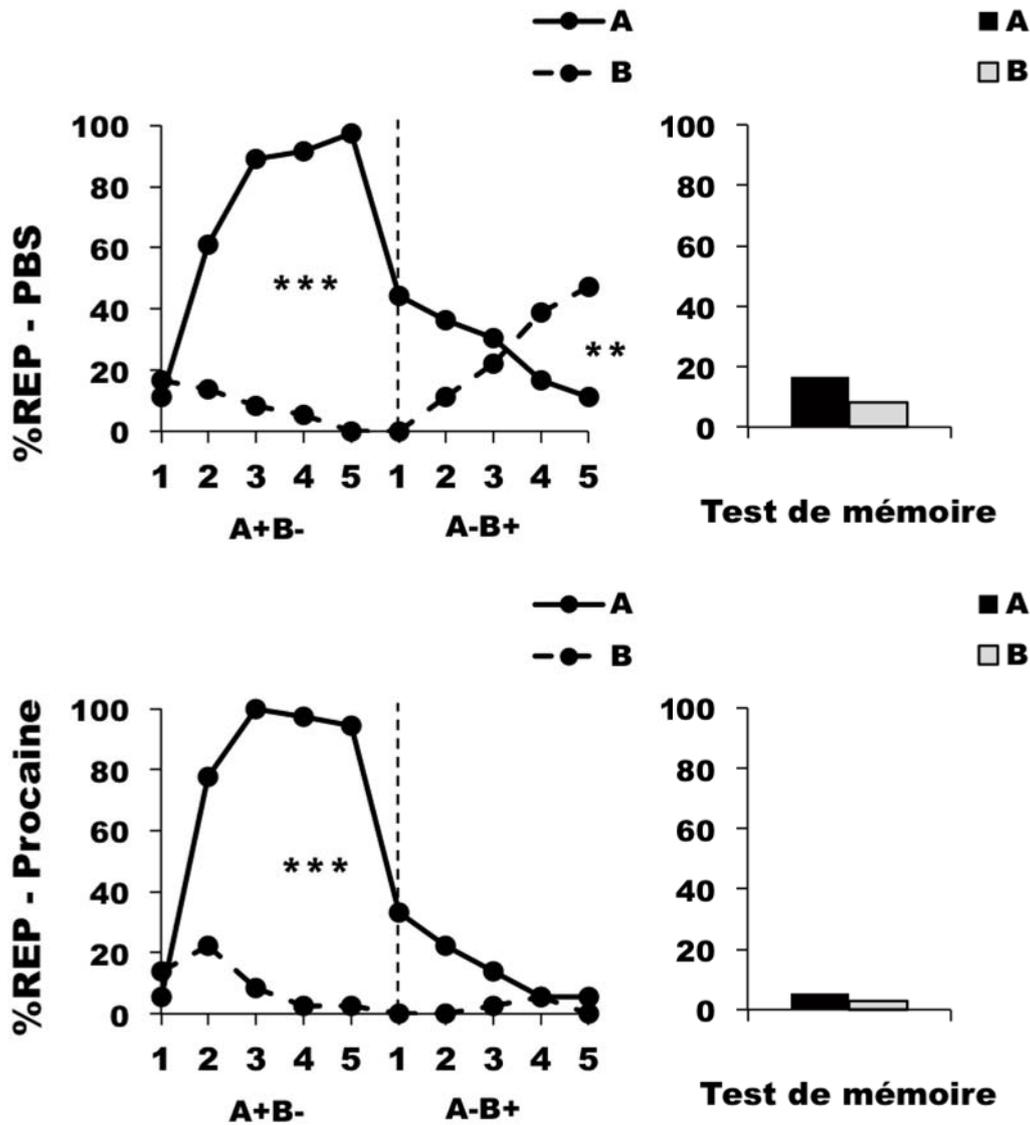


FIGURE 3.1 – L’anesthésie des CP altère l’acquisition et le rappel de l’inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 36$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Procaine ($n = 36$, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l’étape d’injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

groupe injecté à la Procaïne au groupe contrôle.

D'une part, l'effet délétère de l'anesthésiant sur la capacité d'inversion de consigne se manifeste, en plus des éléments présentés précédemment, par la différence de la proportion d'abeilles considérées comme apprenantes entre les deux groupes. Pour chacune des conditions (contrôle ou Procaïne), les individus ont été catégorisés *a posteriori* d'après le nombre de réponses à chaque odeur lors du dernier essai de conditionnement de la seconde phase, et ont été classées comme apprenantes les abeilles ayant répondu davantage à l'odeur renforcée ($RC_{B+} > RC_{A-}$ à l'essai 5) et comme non apprenantes celles ayant répondu de façon équivalente ou inverse ($RC_{B+} \leq RC_{A-}$ à l'essai 5). Ce critère est distinct de celui utilisé à l'issue de la première phase puisque les courbes de réponses se croisent, une analyse de variance à l'échelle globale n'est donc pas pertinente. Au sein du groupe contrôle, 40% des abeilles sont d'après ce critère considérées comme apprenantes et donc 60% comme non apprenantes, tandis que dans le groupe injecté par la Procaïne, plus aucune abeille n'est apprenante (la part de non apprenantes est de ce fait passée à 100% du groupe expérimental). La différence de proportion à l'échelle de l'échantillon est bien évidemment statistiquement significative, par une ANOVA à mesures répétées sur le dernier essai de conditionnement (facteur groupe : $F_{1,35} = 22,27$; $P < 0,001$). Cette diminution drastique et totale de la quantité d'abeilles capables d'inverser la consigne après l'anesthésie des lobes verticaux des CP indique que l'activité issue de ces structures est effectivement un élément indispensable à la capacité

d'apprentissage de cette tâche, comme démontré précédemment par Devaud et coll. [48].

D'autre part, une chute de rappel pour l'odeur A est observable entre la fin de la première et le début de la seconde phase pour les deux groupes. Cette chute se manifeste par un taux de réponse diminué de 53 points pour le groupe PBS (97% au dernier essai de la phase 1 / 44% au premier essai de la phase 2) et de 61 points pour le groupe PTX (94% / 33%) respectivement. Ceci peut être attribué directement au geste d'injection et non à l'action de la drogue puisque cette baisse de réponse à l'odeur précédemment renforcée n'est pas différente entre les deux groupes (ANOVA à mesures répétées sur la différence entre les deux essais, facteur groupe : $F_{1,35} = 0,16$; $P > 0,05$). Malgré cette chute de réponse, les abeilles se rappellent du renforcement de l'odeur A puisqu'en début de seconde phase le taux de réponse à A^- reste statistiquement supérieur à celui de B^+ quelque soit le produit injecté (test post-hoc de Tukey : $P < 0,001$ à l'essai 1 pour les deux groupes et $P = 0,02$ à l'essai 2 pour le groupe Procaine). L'absence d'inversion exprimée par les abeilles injectées à la Procaine ne peut donc pas être attribuée à une détérioration du rappel, d'une part puisque le groupe contrôle présente également cet effet en dépit de la capacité à inverser ultérieurement, et d'autre part car cette diminution du niveau de rétention de l'odeur initialement conditionnée après les injections est cohérent au rôle joué par les lobes verticaux durant le rappel de la mémoire olfactive [14,111]. De plus, Devaud et coll. [48] ont démontré l'indépendance de

la perte de capacité d'inversion de consigne vis à vis de ce phénomène de rappel.

Cette première expérience confirme donc les résultats obtenus précédemment au sein de l'équipe [48] et démontre à nouveau que le blocage de la signalisation de sortie des CP par l'injection d'un anesthésiant dans les lobes verticaux empêche effectivement l'inversion de consigne. Ces résultats indiquent que les CP intacts et fonctionnels jouent un rôle général prépondérant dans l'acquisition de cette tâche ambiguë [21, 46, 48] sans pour autant fournir d'indications plus précises quant aux réseaux et aux circuits neuronaux sous-jacents à ce mécanisme.

3.2 Rôle des récepteurs ionotropiques au GABA des calices dans l'inversion de consigne.

3.2.1 Injection de PTX dans les calices au cours d'une inversion de consigne.

Après avoir démontré la nécessité de l'information transmise par les CP *via* les lobes verticaux (paragraphe 3.1, [48]), nous avons cherché à déterminer plus précisément quels sont les réseaux de neurones associés aux CP et issus des lobes qui transmettent cette information cruciale pour l'apprentissage de l'inversion de consigne. Pour cela, les abeilles ont été injectées de la même façon que précédemment entre les deux phases de conditionnement par la so-

lution contrôle (PBS, $n = 40$) ou, à la place de la Procaïne cette fois-ci, par un antagoniste des récepteurs ionotropiques du GABA, la PicROTOXINE (PTX $5 \mu\text{M}$, $n = 40$) au niveau des calices des CP. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.2 (page 92). Comme dans l'expérience précédente, les abeilles ont au préalable correctement appris la discrimination entre A^+ et B^- lors de la première phase puisque le taux de réponse à A^+ est significativement plus élevé que celui à B^- dès le second essai de conditionnement (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,39} = 229,41$; PTX : $F_{1,39} = 248,26$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5). L'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,39} = 49,73$; PTX : $F_{4,39} = 49,34$; $P < 0,001$) les deux courbes de réponse suivent donc des profils clairement différents. Les deux groupes ne montrent pas non plus de différence d'acquisition de la première phase avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 0,69$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,74} = 0,45$; $P > 0,05$). Après injection, les abeilles des deux groupes présentent un bon rappel de l'odeur précédemment renforcée (test post-hoc de Tukey : $P < 0,001$ pour le premier essai), néanmoins seules les abeilles contrôles ont été capables par la suite d'inverser statistiquement leurs réponses entre les deux odeurs d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, interaction odeur x essais : $F_{4,39} = 29,26$; $P < 0,001$) et le test post-hoc de Tukey appliqué lors du dernier essai ($P = 0,006$). L'injection de PTX a quant à elle affecté l'acquisition

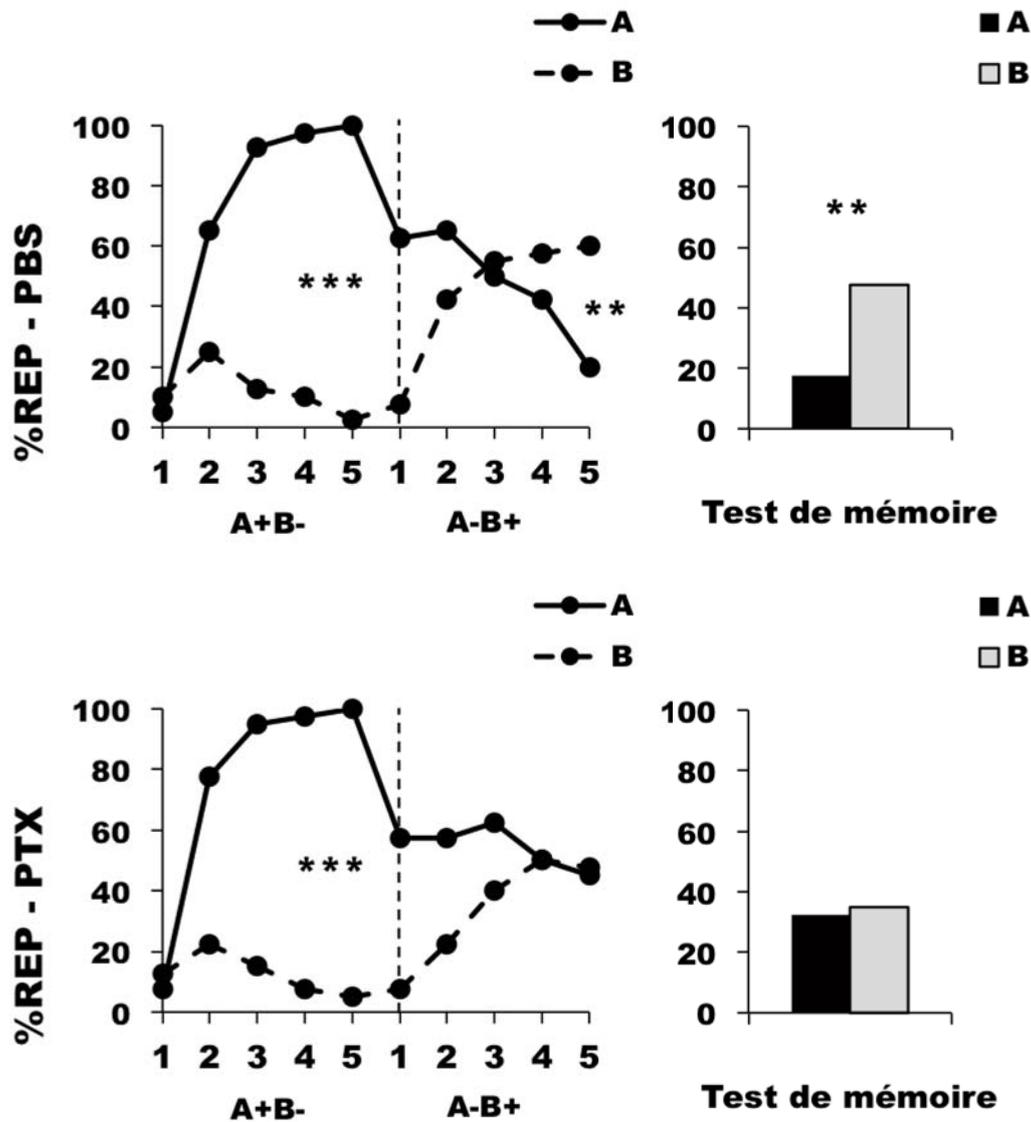


FIGURE 3.2 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l'acquisition et le rappel de l'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la PicROTOXINE ($n = 40$, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

de cette tâche, les abeilles répondant de façon équivalent aux deux odeurs y compris en fin de conditionnement (interaction odeur x essais : $F_{4,39} = 9,33$; $P < 0,001$; test post-hoc de Tukey : $P > 0,05$ pour l'essai 5). Les pourcentages de réponses spécifiques lors du dernier essai de conditionnement en fonction du groupe sont représentés dans la Figure 3.3 (page 94). Ce pourcentage de réponse spécifique se calcule comme étant la proportion d'abeilles répondant correctement à la fin du conditionnement, c'est-à-dire répondant à l'odeur B^+ et non à l'odeur A^- lors du dernier essai de la seconde phase de conditionnement. La comparaison de ces pourcentages de réponses spécifiques a été effectuée d'un point de vue statistique par le suivi d'une procédure analogue au test de Dunnett [90], et montre une altération claire de spécificité d'acquisition de la tâche pour le groupe injecté à la Picrotoxine. Cette observation lors de la phase d'apprentissage se reflète également lors du test de mémoire effectué une heure après, qui ne démontre aucune différence dans les taux de réponse à A et B chez les abeilles injectées par l'antagoniste ($F_{1,39} = 0,11$; $P > 0,05$) tandis que les abeilles du groupe contrôle se sont visiblement rappelé des associations acquises ($F_{1,39} = 9,85$; $P = 0,003$).

Entre autres hypothèses, on peut également supposer d'après le profil des courbes d'acquisition de la seconde phase que les abeilles injectées par l'antagoniste sont toujours capables d'opérer l'activation de la réponse à B, mais plus l'inhibition de la réponse à A. En effet, les taux de réponses à B^+ augmentent de façon significative chez ce groupe (montée de la courbe, ANOVA à mesures

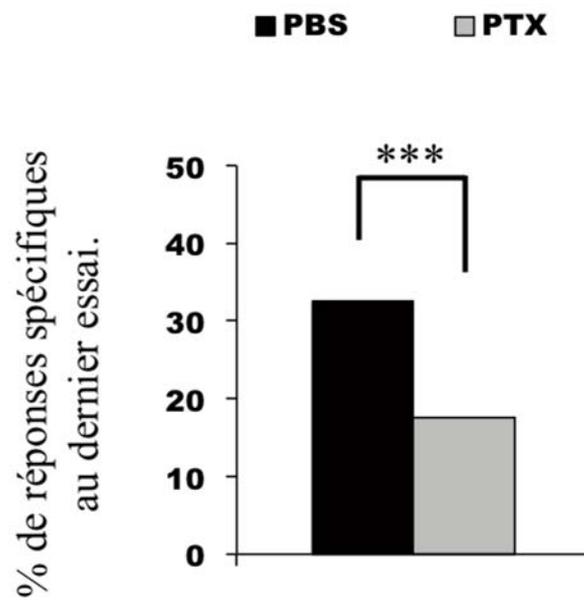


FIGURE 3.3 – Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de l'inversion de consigne de la Figure 3.2 (page 92), entre le groupe contrôle injecté au PBS ($n = 40$, en noir) et celui injecté à la PTX ($n = 40$, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$.

répétées, facteur essais ; PBS : $F_{4,39} = 23,75$; PTX : $F_{4,39} = 10,64$; $P < 0,001$ pour les deux groupes), contrairement aux taux de réponse à A^- (baisse de la courbe, ANOVA à mesures répétées, facteur essais ; PBS : $F_{4,39} = 12,90$; $P < 0,001$; PTX : $F_{4,39} = 2,02$; $P > 0,05$). Ces deux mécanismes, l'activation de la réponse à B et l'inhibition de la réponse à A, semblent donc distincts, l'effet cognitif causé par l'antagoniste du récepteur ionotropique au GABA paraît donc être du à un défaut global de l'acquisition de la tâche (combinaison des deux opérations), indépendamment de chaque opération A / B.

Dans la Figure 3.2 (page 92), on pourrait également suspecter chez le groupe injecté à l'antagoniste une tendance à inverser, puisque les courbes A^- et B^+ se rejoignent au dernier essai et pourraient prédire une inversion des taux de réponse pour un nombre d'essais plus important. Ceci suppose que l'inversion de consigne pourrait ne pas être absente, mais être simplement retardée, suite à l'injection de PTX dans les calices. Deux arguments principaux infirment cette possibilité. Premièrement, étant donné qu'une heure de consolidation de mémoire a eu lieu entre le conditionnement et le test, il paraît très probable que si ces abeilles étaient effectivement capables d'apprendre mais de façon retardée elles auraient été susceptibles d'exprimer une mémoire de discrimination à l'issue de l'étape de consolidation. En effet, le test de mémoire en lui-même constitue un essai supplémentaire, car même en l'absence du renforcement les abeilles doivent répondre à chaque odeur en fonction des associations apprises. Pour les deux groupes, PBS comme PTX, le niveau de

réponse à A et B est identique entre le dernier essai de la seconde phase de conditionnement et le test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur essais ; odeur A ; PBS : $F_{1,39} = 0,33$; PTX : $F_{1,39} = 1,69$; odeur B ; PBS : $F_{1,39} = 3,82$; PTX : $F_{1,39} = 1,97$; $P > 0,05$ pour tous les groupes). Il apparaît donc que le fait d'ajouter un essai supplémentaire n'améliore pas les performances, que ce soit concernant l'inversion démontrée pour le groupe contrôle, ou l'absence d'inversion qui persiste pour le groupe injecté à la Picrotoxine. Deuxièmement, nous avons déjà démontré ci-dessus que le niveau de réponse à A de ce groupe ne diminue pas lors de la seconde phase, ce qui confirme le fait qu'il paraît peu probable qu'une inversion puisse avoir lieu de façon retardée puisque la courbe de réponse à l'odeur non renforcée reste stable pendant les 5 essais. Il semble donc que l'absence d'apprentissage de l'inversion de consigne ne soit pas simplement liée à un retard d'acquisition, mais soit effective et la conséquence d'un blocage du signal GABAergique au niveau des calices des CP. Néanmoins, il serait tout à fait possible de confirmer cet argument par une expérience supplémentaire d'inversion de consigne impliquant plus d'essais de conditionnement (par exemple en proposant 7 présentations de A et 7 présentations de B dans chacune des phases), ce qui permettrait de vérifier que malgré l'ajout d'essais les abeilles injectées à la PTX ne sont pas capables d'inverser, et ainsi que l'effet de la drogue sur le comportement est indépendant d'un retard d'apprentissage.

En conséquence, l'inhibition exercée par la neurotransmission GABAergique

sur les calices des CP et transmise par les récepteurs-canaux semble être un élément nécessaire à la résolution d'un apprentissage d'inversion de consigne, puisque son altération *via* l'injection d'un antagoniste de ces récepteurs perturbe l'acquisition et l'expression du comportement associé.

3.2.2 Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage simple.

L'expérience précédemment décrite a mis en évidence que le blocage de l'afférence d'information de type GABAergique dans les calices par l'injection de Picrotoxine altérait l'apprentissage de l'inversion de consigne. Néanmoins, cette expérience ne suffit pas en elle-même pour conclure plus largement, et nécessite de contrôler l'effet de l'antagoniste avant un apprentissage élémentaire non ambigu. Cet apprentissage contrôle avait pour objectif de vérifier, d'une part que les processus de l'olfaction et de l'apprentissage simples ne sont pas dégradés, et d'autre part que ce signal GABAergique est spécifiquement requis lors d'un apprentissage ambigu mais non lors d'un apprentissage purement élémentaire. Pour cela, les odeurs A et B utilisées en première phase ont été remplacées au cours d'une expérience contrôle distincte par des odeurs différentes C et D en seconde phase après injection de PBS ($n = 42$) ou de PTX ($n = 42$), ce qui lève l'ambiguïté entre les sessions d'apprentissage. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.4 (page 99). Le protocole ne constitue alors plus une inversion de consigne, mais est ramené à une succession de

deux conditionnements différentiels simples et indépendants ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$). Cette méthode, qui consiste à associer systématiquement un contrôle à l'expérience de type ambigu tout au long de ce présent travail permet de s'assurer, à chaque étape, de l'intégrité des processus olfactifs y compris chez les abeilles injectées à l'agent pharmacologique et a de ce fait constitué une trame de travail prédominante pour cette thèse.

Concernant cette expérience, toutes les abeilles ont appris correctement la première phase $A^+ B^-$ en discriminant efficacement les deux odeurs d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 265,31$; PTX : $F_{1,41} = 502,32$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5). Les deux courbes présentent des profils différents puisque l'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,41} = 54,53$; PTX : $F_{4,41} = 79,19$; $P < 0,001$). Les deux groupes ne montrent pas de différence d'acquisition de la première phase avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,81} = 1,09$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,78} = 0,81$; $P > 0,05$) ce qui autorise par la suite leur répartition dans les groupes d'injection. Les abeilles ont été injectées au niveau des calices puis confrontées au second apprentissage différentiel par les odeurs C^+ (1-heptanal) et D^- (1-nonanol).

A l'issue de cette seconde discrimination simple, les abeilles des deux groupes ont répondu significativement plus à C que D lors du dernier essai d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 96,74$;

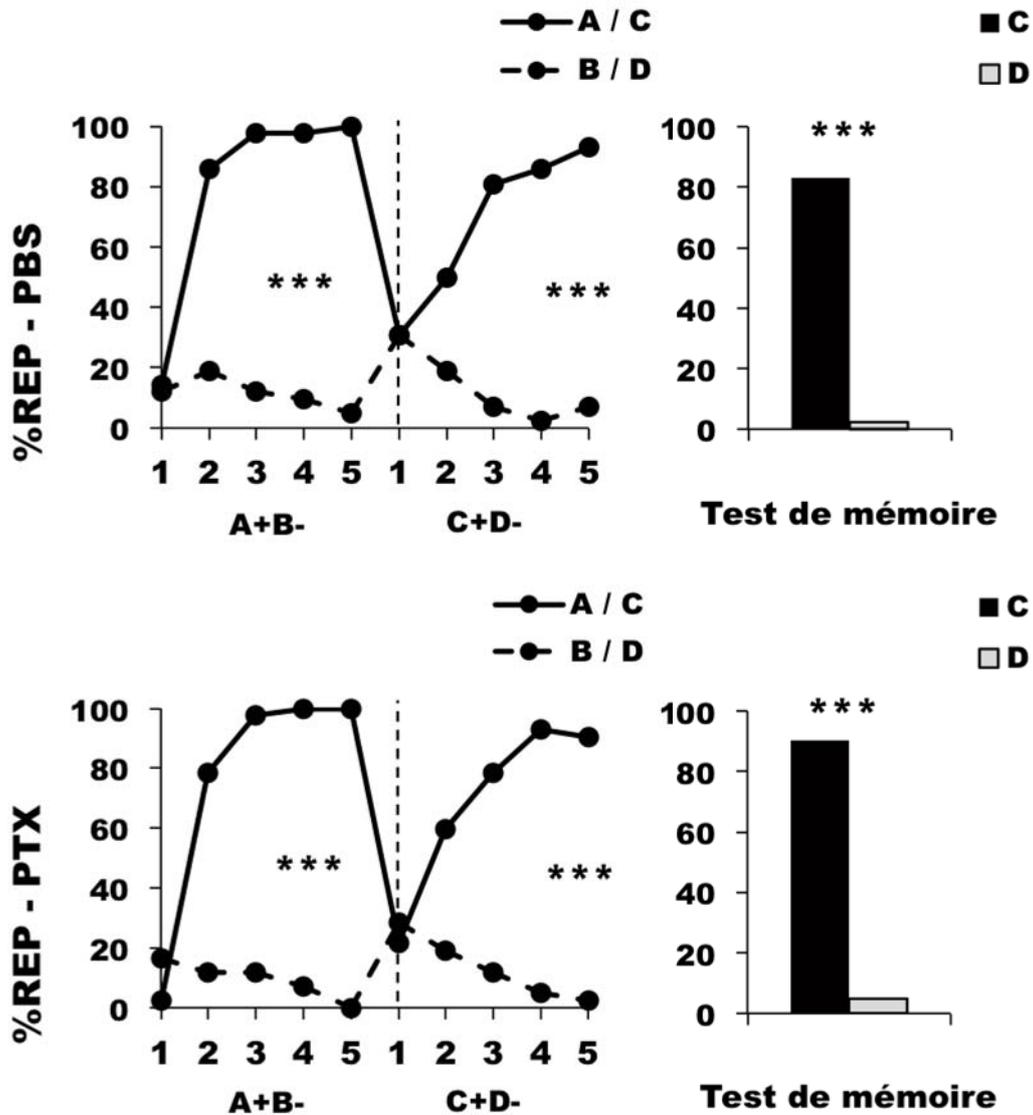


FIGURE 3.4 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de deux phases de discrimination simples ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement (A / C : ligne pleine; B / D : ligne en tirets) et du test de rétention à une heure (C : barre noire; D : barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 40$, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

PTX : $F_{4,41} = 108,01$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey appliqué lors du dernier essai (PBS : $P = 0,005$ pour l'essai 2 et $P < 0,001$ pour les essais 3 à 5 ; PTX : $P < 0,001$ pour les essais 2 à 5) ainsi que lors du test de rétention de mémoire (PBS : $F_{1,41} = 174,25$; PTX : $F_{1,41} = 246,00$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). L'injection de Picrotoxine dans les calices n'ayant pas eu d'effet lors de cette expérience, l'afférence du signal GABAergique inhibiteur sur les calices du CP semble donc être nécessaire à la résolution d'un apprentissage d'inversion de consigne (paragraphe 3.2.1) mais pas lors d'une discrimination simple élémentaire comme détaillée ici.

Les circuits neuronaux touchés apparaissent alors comme étant des structures spécifiquement requises pour des formes computationnelles élaborées mais indépendantes de processus cognitifs élémentaires de l'apprentissage associatif olfactif, ce qui suggère aussi une spécialisation des aires cérébrales en fonction du niveau de complexité des tâches cognitives.

3.2.3 La parcimonie dans les résolutions du problème.

En dehors de l'effet observé de l'antagoniste du GABA sur le comportement, les expériences ci-dessus laissent apercevoir que, contrairement aux concepts et théories de l'apprentissage en vigueur, les abeilles n'utiliseraient pas nécessairement la stratégie la plus simple - donc la plus parcimonieuse - pour résoudre le problème proposé. Le principe de parcimonie et de représen-

tation parcimonieuse des signaux dans le cerveau, consiste à n'utiliser que le minimum de causes élémentaires et simples pour expliquer la congruence de ces signaux, et implique donc en théorie que la résolution cognitive d'une tâche reposerait sur une association linéaire des stimuli. Ceci implique alors l'usage d'une stratégie élémentaire. Selon ce principe, il est attendu que les abeilles auraient naturellement tendance à employer une stratégie parcimonieuse dans la résolution de tâches dans la mesure où celles-ci admettent une résolution élémentaire, comme lors d'un protocole d'inversion de consigne. L'expérience précédente (paragraphe 3.2.1) tend cependant à démontrer le contraire. En effet, 40% des abeilles contrôles ont été catégorisées comme apprenantes ($RC_{B+} > RC_{A-}$ à l'essai 5) et 60% comme non apprenantes ($RC_{B+} \leq RC_{A-}$ à l'essai 5) lors de la seconde phase. Dans le groupe injecté par l'antagoniste en revanche, seulement 20% des abeilles restent apprenantes et 80% non apprenantes. La diminution entre les deux groupes du nombre d'abeilles capables de résoudre la tâche est statistiquement significatif ($F_{1,39} = 4,65$; $P = 0,04$) et indique que si l'injection de PTX bloque effectivement les processus d'apprentissage de type non élémentaire comme le soutient notre hypothèse, la différence entre 40 et 20% d'abeilles apprenantes entre les deux groupes constituerait la part d'animaux utilisant une stratégie non parcimonieuse. Ceci implique donc qu'environ la moitié des abeilles apprenantes (soit 20% des abeilles d'une population naturelle) semble avoir utilisé une stratégie non élémentaire, part qui serait perdue entre le groupe contrôle et le groupe injecté par la PicROTOXINE d'après notre

hypothèse, tandis que l'autre partie (20% des abeilles également) semble avoir utilisé une stratégie de type élémentaire qui constitue la part d'abeilles toujours capables de résoudre le problème suite à l'injection de PicROTOXINE. Ces deux proportions d'apprenantes et non apprenantes sont similaires et suggèrent donc que les préférences pour l'une ou l'autre des stratégies sont réparties équitablement dans la nature. Le restant du groupe (soit 60% de la population) serait constitué d'abeilles dites non apprenantes, incapables de résoudre la tâche, et ce par aucune des deux stratégies. Cette proportion d'abeilles inaptes à résoudre ce type de problème peut sembler assez élevée. Au delà d'un défaut purement technique ou mécanique au cours du conditionnement qui pourrait expliquer cette absence d'acquisition, ces animaux soulèvent des interrogations quant aux caractéristiques évolutives et adaptatives d'une colonie comprenant ce type d'individus, et à l'utilisation des différentes stratégies de résolution ainsi que l'absence de résolution seront développées au cours de la discussion. En revanche, lors de l'expérience contrôle qui ne présente plus d'ambiguïté (paragraphe 3.2.2), le groupe contrôle tout comme le groupe injecté à la PTX présentent globalement des proportions d'individus équivalentes, à savoir environ 85% des abeilles considérées comme apprenantes et environ 15% de non apprenantes dans les deux groupes qui ne diffèrent pas significativement d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,39} = 0,11$; $P > 0,05$). Ceci confirme que l'injection de PTX n'a pas eu d'effet sur la capacité de résolution de cette tâche contrôle, et également que la part d'abeilles capables de

résoudre la tâche est plus élevée lors d'un apprentissage simple [$A^+ B^-$ puis $C^+ D^-$] que lors de l'apprentissage ambigu correspondant [$A^+ B^-$ puis $A^- B^+$].

Ces résultats indiquent ainsi que les abeilles résolvent ce type de problème d'inversion non seulement par une approche parcimonieuse élémentaire ($A^+ B^- / A^- B^+$), mais également, et à un niveau comparable, par une approche non élémentaire ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$), ce qui constituerait la stratégie la plus coûteuse en terme de mécanismes cognitifs.

3.2.4 Injection de PTX dans les calices avant une extinction de mémoire.

Deux possibilités peuvent expliquer l'absence d'inversion de consigne chez les abeilles injectées à la Picrotoxine décrite dans la première expérience. (i) La première hypothèse implique que l'injection de Picrotoxine dans les calices pourrait avoir entraîné une réduction du niveau initial de réponse à A en seconde phase par rapport au dernier essai de la phase précédente. Dans ce cas, un pourcentage trop faible de réponse ne permettrait pas par la suite une diminution suffisante et ainsi passer sous la courbe de réponse à B et créer ainsi une inversion. Mais dans le cas ici présent, il s'avère que le rappel de A au premier essai n'est pas affecté par l'injection puisqu'il est statistiquement identique entre les deux groupes, soit 60% de rappel en moyenne (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; $F_{1,39} = 0,05$; $P > 0,05$). La Picrotoxine

n'ayant pas d'effet sur le rappel, l'absence d'inversion ne peut donc pas être attribuée à un niveau initial de réponse trop faible. (ii) La seconde hypothèse concerne le processus d'extinction de mémoire, nécessaire à la réduction de la réponse à A (odeur précédemment renforcée) tout au long de la seconde phase. Diminuer la réponse par l'extinction de la mémoire associative formée lors de la première phase est indispensable pour permettre l'apprentissage de la nouvelle consigne et l'inversion des réponses. Si l'injection de PicROTOXINE affecte effectivement ce processus, les abeilles ne pourront pas apprendre la tâche par le simple fait que la ré-acquisition de A est compromise. Comme le taux de réponse à A^- des abeilles injectées à la PicROTOXINE ne diminue pas au cours de la seconde phase (pour rappel : ANOVA à mesures répétées, facteur essais ; $F_{4,39} = 2,02$; $P > 0,05$), nous avons testé par une expérience distincte si le processus d'extinction était effectivement affecté chez ce groupe, en présentant lors de la seconde phase les odeurs A et B non récompensées (expérience d'extinction, $A^- B^-$). Les résultats sont présentés dans la Figure 3.5 (page 105).

Les groupes PBS ($n = 40$) et PTX ($n = 40$) ont correctement appris la première phase en répondant de façon plus importante à A^+ qu'à B^- (PBS : $F_{1,39} = 276,83$; PTX : $F_{1,39} = 418,76$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) ce qui est confirmé par le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5). L'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,39} = 38,09$; PTX : $F_{4,39} = 50,68$; $P < 0,001$) puisque les réponses à A et B suivent des courbes bien distinctes. Les abeilles des deux conditions

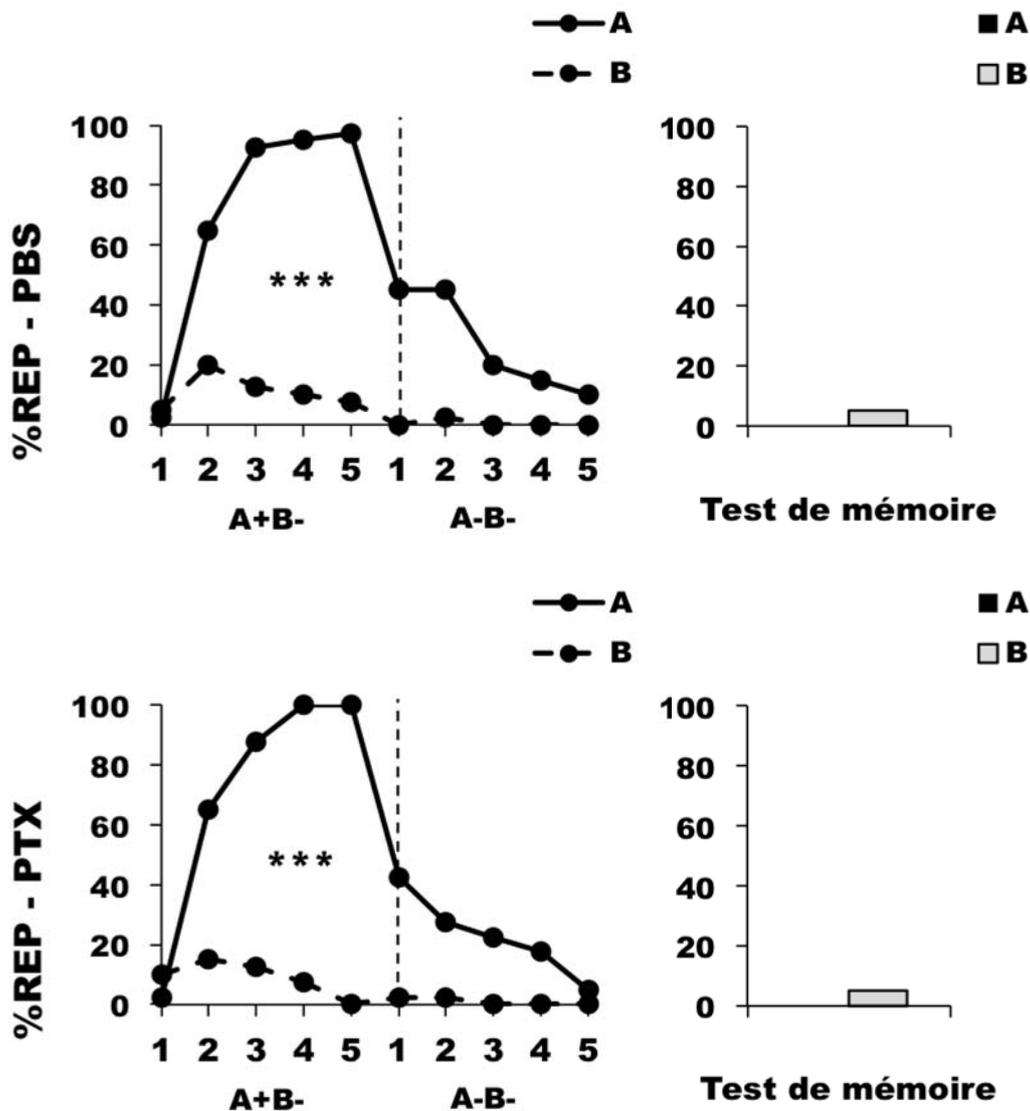


FIGURE 3.5 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel de l’extinction de mémoire ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la PicROTOXINE ($n = 40$, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l’étape d’injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

ne montrent pas non plus de différence d'acquisition de la première phase avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 0,39$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,74} = 1,19$; $P > 0,05$) et présentent également, après avoir été injectées, un bon rappel de l'odeur précédemment renforcée (test post-hoc de Tukey : $P < 0,001$ pour le premier essai de la phase 2) ainsi qu'une diminution significative de la réponse à A au cours de la seconde phase d'extinction $A^- B^-$ (ANOVA à mesures répétées, facteur essais : PBS : $F_{4,39} = 9,64$; PTX : $F_{4,39} = 6,48$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Cette diminution est statistiquement identique entre le groupe PicROTOXINE et le groupe contrôle (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{1,39} = 0,51$; $P > 0,05$; interaction groupe x essais : $F_{4,39} = 1,46$; $P > 0,05$). Dans les deux cas, l'extinction de la réponse à A était complète étant donné qu'à la fin de la seconde phase, les réponses à cette odeur ne sont statistiquement pas différentes de zéro au dernier essai (t-test : $t_{1,39} = 1,43$; $P > 0,05$). Les réponses à B sont restées très faibles et se sont maintenues entre les deux phases puisque B n'est jamais renforcé lors de cette phase. Les abeilles n'ont pas discriminé les odeurs lors du test de rétention ($P > 0,05$ pour les deux groupes).

En résumé, les trois expériences précédentes concernant l'inversion de consigne (Figure 3.2), son contrôle (Figure 3.4) ainsi que le protocole d'extinction (Figure 3.5) démontrent que l'inhibition des CP exercée par un signal GABAergique afférent aux calices (et bloqué par la PicROTOXINE) est spécifiquement

nécessaire à l'apprentissage de l'inversion de consigne. Ni le rappel de mémoire olfactive ni le processus d'extinction de mémoire n'ont été affectés par l'injection de Picrotoxine, l'absence d'inversion semble donc avoir été causée par une perturbation globale du processus de réécriture de la trace mnésique. Alors que l'augmentation de réponse à B et la diminution de réponse à A semblent être opérés indépendamment, l'incapacité d'apprendre la tâche d'inversion n'est vraisemblablement pas due à un défaut d'acquisition de changements des contingences de renforcement, mais à l'échec global d'actualisation de l'ensemble des associations apprises.

3.3 Rôle des récepteurs métabotropiques au GABA dans l'inversion de consigne.

Le paragraphe précédent (3.2.1) a démontré que l'apprentissage de l'inversion de consigne requiert un signal GABAergique inhibiteur au niveau des calices, *via* une signalisation rapide par les récepteurs-canaux ionotropiques au GABA. Nous avons donc cherché à déterminer si les récepteurs métabotropiques au GABA étaient également impliqués dans ce mécanisme, par une signalisation plus longue à s'établir et durable dans le temps notamment au travers de la régulation d'expression de gènes. Pour cela, les abeilles ont été injectées entre les deux phases de conditionnement par la solution contrôle (PBS, $n = 40$) ou par un antagoniste des récepteurs métabotropiques du GABA, la

*CGP*₅₄₆₂₆ hydrochloride (*CGP*₅₄₆₂₆ 250 μ M, n = 40). Les résultats sont présentés dans la Figure 3.6 (page 109). Les abeilles ont au préalable réussi l'acquisition de la discrimination entre A^+ et B^- lors de la première phase en répondant davantage à l'odeur A qu'à l'odeur B d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur odeur; PBS : $F_{1,39} = 222,37$; *CGP*₅₄₆₂₆ : $F_{1,39} = 141,31$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5). Les courbes de réponses pour chaque odeur suivent des profils différents puisque l'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,39} = 49,73$; *CGP*₅₄₆₂₆ : $F_{4,39} = 36,66$; $P < 0,001$). Les deux groupes ne montrent pas de différence d'acquisition de la première phase avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 0,61$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,74} = 1,14$; $P > 0,05$).

Après injection, les abeilles des deux conditions présentent un bon rappel de l'odeur précédemment renforcée (test post-hoc de Tukey : $P < 0,001$ pour le premier essai). Elles ont été capables d'inverser leurs réponses au dernier essai de la seconde phase $A^- B^+$ d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, interaction odeur x essais; PBS : $F_{4,39} = 30,85$; *CGP*₅₄₆₂₆ : $F_{4,39} = 21,21$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey appliqué en fin de conditionnement (PBS : $P < 0,001$ pour les essais 4 et 5; *CGP*₅₄₆₂₆ : $P < 0,001$ pour l'essai 5) et présentent des profils de réponses pour A et B statistiquement similaires (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe; courbe A^- : $F_{1,39} = 0,57$; $P > 0,05$; courbe B^+ : $F_{1,39} = 0,04$; $P > 0,05$).

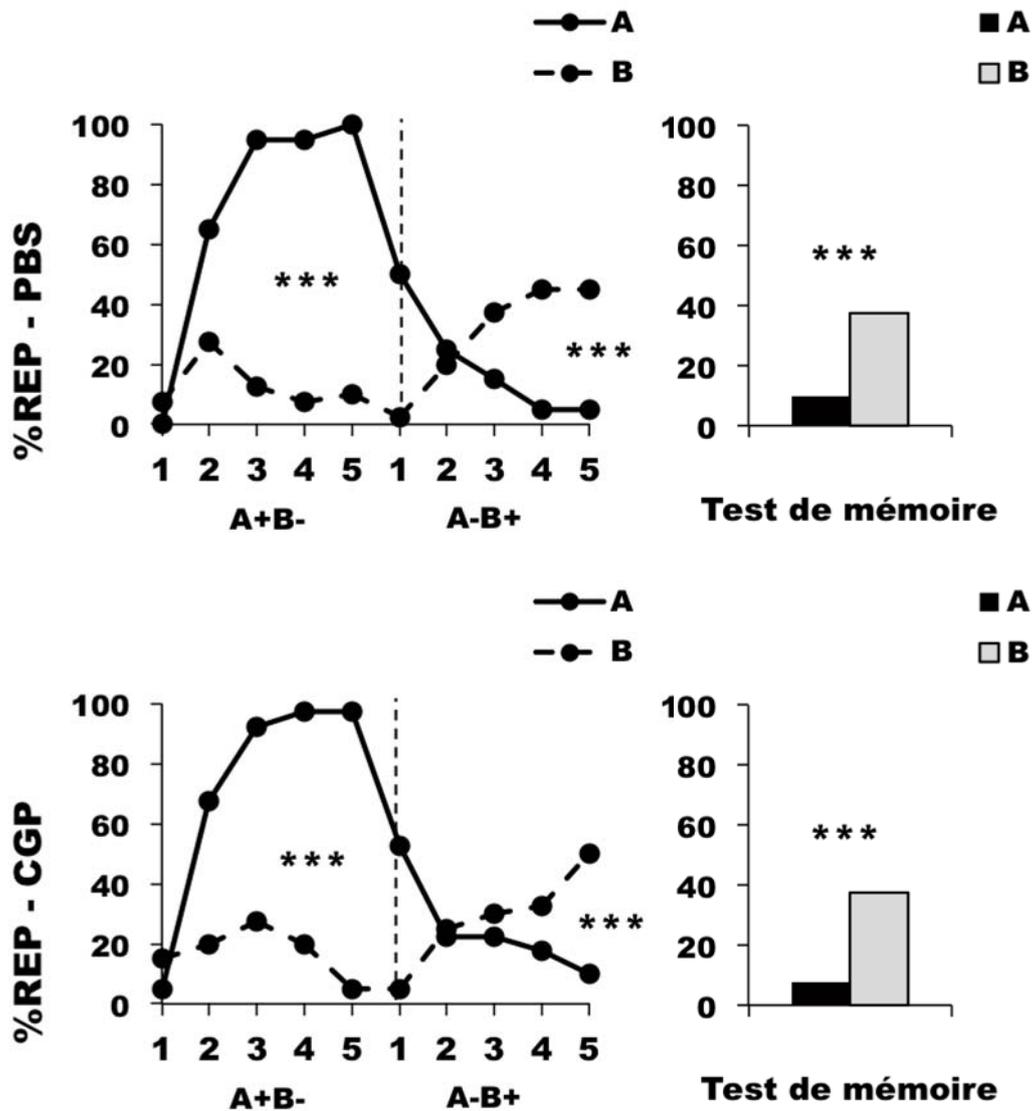


FIGURE 3.6 – Le blocage des récepteurs au GABA métabotropiques des calices des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel de l’inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la CGP_{54626} ($n = 40$, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l’étape d’injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Cet apprentissage se reflète également lors du test de mémoire par une réponse différente entre les odeurs (PBS : $F_{1,39} = 14,79$; CGP_{54626} : $F_{1,39} = 16,71$; $P < 0,001$ pour les deux groupes).

Catégorisation des abeilles.

Que ce soit dans le groupe contrôle ou dans le groupe injecté par l'antagoniste, 40% des abeilles contrôles ont été catégorisées comme apprenantes ($RC_{B+} > RC_{A-}$ à l'essai 5) et 60% comme non apprenantes ($RC_{B+} \leq RC_{A-}$ à l'essai 5) lors de la seconde phase. Les deux groupes présentent globalement des proportions équivalentes et ne diffèrent pas significativement d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,39} = 0,06$; $P > 0,05$), ce qui confirme que le blocage des récepteurs métabotropiques n'altère pas la résolution du problème. En conséquence, l'inhibition exercée sur les calices nécessaire à la résolution d'une inversion de consigne ne semble pas être dépendante des récepteurs métabotropiques du GABA.

En résumé des résultats obtenus jusqu'à présent, l'inhibition des CP repose vraisemblablement sur un signal GABAergique au niveau des calices qui est transmis par les récepteurs-canaux ionotropiques, et semble être indépendant de la fonction des récepteurs métabotropiques. Cette inhibition, véhiculée par les récepteurs de type ionotropique, est donc vraisemblablement impliquée de façon spécifique dans la capacité des abeilles à apprendre la tâche d'inversion

de consigne, et donc à résoudre l'ambiguïté de renforcement des stimuli. Suite à cette conclusion, toutes les expériences présentées ultérieurement reposeront sur des injections de Picrotoxine et non de CGP_{54626} , puisque seuls les récepteurs de type ionotropique semblent avoir un effet sur la neurotransmission étudiée ici.

3.4 Le signal GABAergique est requis au niveau des calices des corps pédonculés.

Dans le cerveau de l'abeille, deux sous-populations des neurones GABAergiques récurrents du groupe A3 innervent les aires des lobes des corps pédonculés [43, 50, 53, 62]. Le faisceau issu de la sous-population dorsale du groupe (A3-d) innerve ventralement le lobe médian et pénètre le lobe vertical, tandis que la sous-population ventrale (A3-v) s'arborise principalement dans le lobe vertical et projette dans les calices et notamment dans la zone de l'anneau basal, recevant des afférences sensorielles mixtes olfactives et gustatives. et dans la zone de la lèvre, recevant des afférences olfactives [50, 62]. L'afférence d'un signal de type GABAergique sur les corps pédonculés n'est donc pas nécessairement originaire d'une boucle récurrente entre les lobes et les calices, mais peut également constituer une inhibition localisée au niveau de la zone d'efférence concernant le groupe dorsal A3-d des neurones récurrents, ou encore émerger de structures inhibitrices extrinsèques aux corps pédonculés.

L'existence de telles afférences issues d'autres aires cérébrales n'a cependant pas encore été démontrée chez l'abeille, même si des études ont décrit chez le criquet un réseau de 60 neurones immuno-réactifs au GABA parmi les cibles des neurones de projection dans la corne latérale [66], appelés inter-neurones de la corne latérale ou INL, qui projettent directement sur les cellules de Kenyon des corps pédonculés. D'après certains travaux, les INL constitueraient une des sources du signal inhibiteur évoqué en réponse à l'odeur conditionnée, démontré par l'enregistrement électro-physiologique des cellules de Kenyon au sein des corps pédonculés [66]. Néanmoins, un argument fort permet d'exclure l'implication des autres réseaux inhibiteurs et non récurrents (population A3-d et INL présents chez le criquet) dans la capacité de résolution non élémentaire. En effet, Devaud et coll. ont démontré que le blocage pharmacologique des lobes verticaux par un agent anesthésiant empêche cette résolution [48]. Cette observation combinée aux expériences présentées ci-dessus renforce l'hypothèse d'une boucle fonctionnelle récurrente de rétrocontrôle entre lobes et calices, puisque les deux aires sont requises pour ce processus, à savoir qu'à la fois un signal excitateur issu des lobes et un signal inhibiteur exercé sur les calices sont requis au niveau des corps pédonculés.

3.4.1 Injection de PTX dans les lobes au cours d'une inversion de consigne.

Afin de confirmer l'implication des fibres A3-v qui innervent les calices, et réfuter la possibilité que les neurones A3-d puissent avoir un effet local au niveau des lobes, des abeilles ont été injectées par la Picrotoxine dans les lobes verticaux, zone innervée par cette seconde sous-population de neurones, entre les deux phases de la tâche d'inversion de consigne. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.7 (page 114). Les deux groupes, PBS ($n = 40$) et PTX ($n = 40$) ont bien discriminé les odeurs lors de la première phase en répondant davantage à A^+ qu'à B^- d'après l'analyse de variance (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,39} = 146,75$; PTX : $F_{1,39} = 180,91$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 2 à 5). L'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,39} = 38,63$; PTX : $F_{4,39} = 46,49$; $P < 0,001$), les courbes présentent donc des profils sensiblement différents. Les deux groupes ne montrent pas de différence d'acquisition de la première phase avant l'injection (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 0,82$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,78} = 0,83$; $P > 0,05$), les abeilles ont donc ensuite été injectées soit par la solution contrôle PBS soit par l'antagoniste PTX dans chacun des lobes verticaux des corps pédonculés. Cette injection avait pour objectif d'être restreinte localement et ainsi cibler spécifiquement la signalisation GABAergique dans le lobe, afin de bloquer l'afférence du signal des

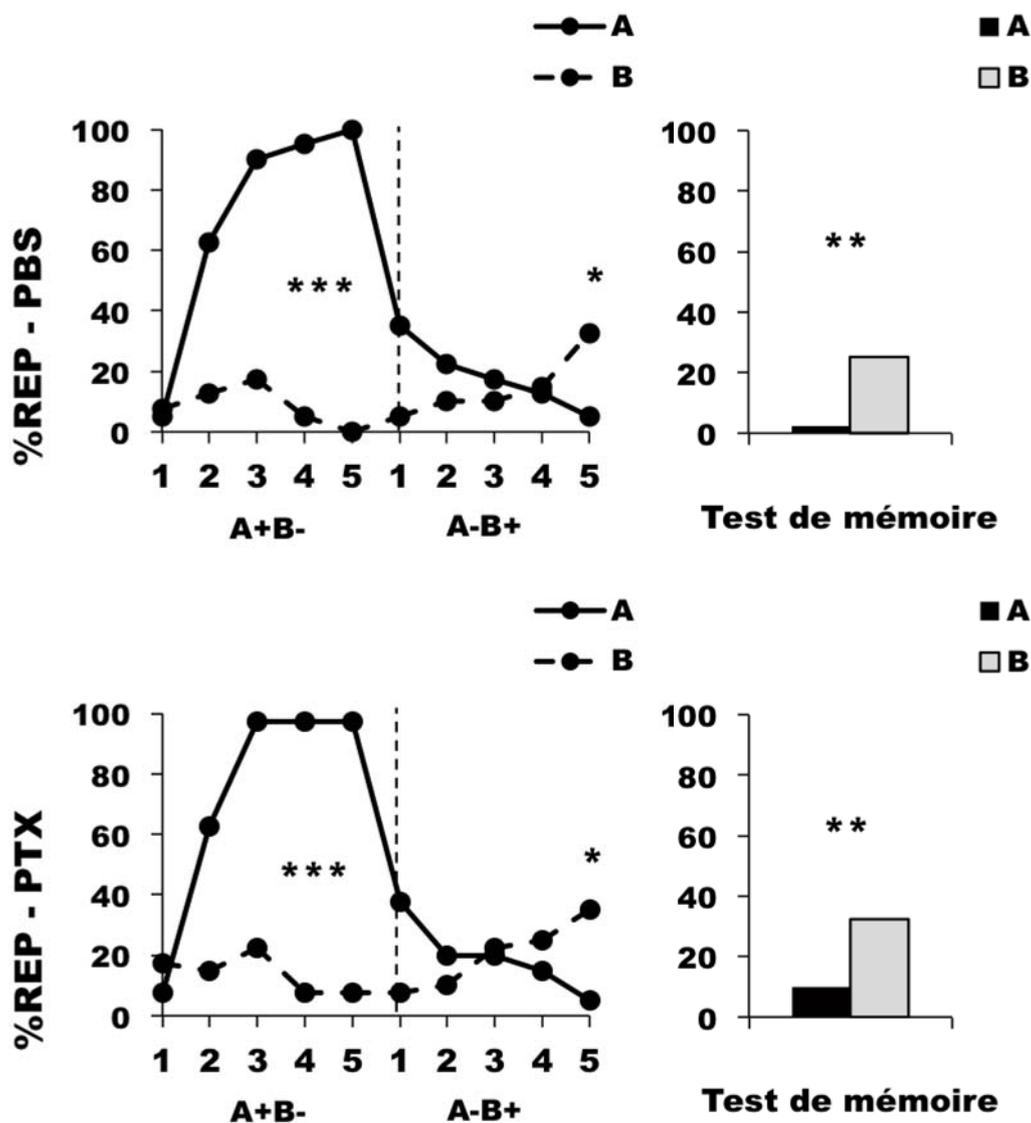


FIGURE 3.7 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel de l’inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 40$, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l’étape d’injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

neurones A3-d. Le rappel de l'odeur précédemment renforcée présente un bon niveau au premier essai de la seconde phase après injection pour les abeilles des deux groupes (test post-hoc de Tukey ; PBS : $P = 0,008$; PTX : $P = 0,024$ pour le premier essai). A l'issue de la seconde phase inverse $A^- B^+$ les deux groupes ont répondu significativement plus à l'odeur B qu'à l'odeur A lors du dernier essai d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, interaction odeur x essais ; PBS : $F_{4,39} = 12,64$; PTX : $F_{4,39} = 12,55$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey (PBS : $P = 0,024$; PTX : $P = 0,020$ à l'essai 5 pour les deux groupes) ainsi que lors du test de mémoire ($F_{1,39} = 11,32$; $P = 0,002$ pour les deux groupes).

L'inhibition du signal GABAergique localement au niveau des lobes verticaux n'a donc pas affecté l'acquisition de cette tâche, ce qui confirme que l'intégrité des corps pédonculés n'est requise qu'au travers de la signalisation dans les calices, et ceci spécifiquement, contrairement à la signalisation localisée au niveau des lobes. Les résultats suggèrent alors que les fibres des neurones récurrents nécessaires à l'inversion de consigne sont donc, à l'évidence, celles formant le groupe ventral (A3-v) qui innervent les calices à partir des arborisations dans les lobes verticaux principalement.

3.4.2 Injection contrôle de PTX dans les lobes au cours d'un apprentissage simple.

Pour confirmer l'effet spécifique de la Picrotoxine sur le blocage des lobes verticaux des corps pédonculés et l'absence de diffusion dans l'ensemble de ces structures, l'ambiguïté du protocole a été levée en remplaçant la seconde phase inverse par une discrimination simple ($C^+ D^-$) comportant des odeurs différentes de celles en première phase ($A^+ B^-$) après l'injection de PBS ($n = 40$) ou de PTX ($n = 40$) de la même façon qu'expliqué dans le paragraphe 3.2.2, mais l'injection concernant ici les lobes verticaux. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.8 (page 117). Les abeilles ont appris correctement la première phase $A^+ B^-$ d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur odeur ; PBS : $F_{1,39} = 227,01$; PTX : $F_{1,39} = 89,49$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ pour les essais 2 à 5). L'interaction odeur x essais est également significative pour les deux groupes (PBS : $F_{4,39} = 38,56$; PTX : $F_{4,39} = 33,58$; $P < 0,001$) et est corrélée à des profils de réponse distincts entre l'odeur renforcée et non renforcée. Les deux groupes montrent une dynamique d'acquisition similaire lors de la première phase (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 1,06$; $P > 0,05$; interaction odeur x groupe : $F_{5,74} = 2,31$; $P > 0,05$). Les abeilles ont été injectées de la même façon qu'au cours de l'expérience précédente et soumises à un second conditionnement différentiel, où les animaux contrôles tout comme ceux injectés à l'antagoniste ont appris avec succès, de par des taux de réponse supérieurs

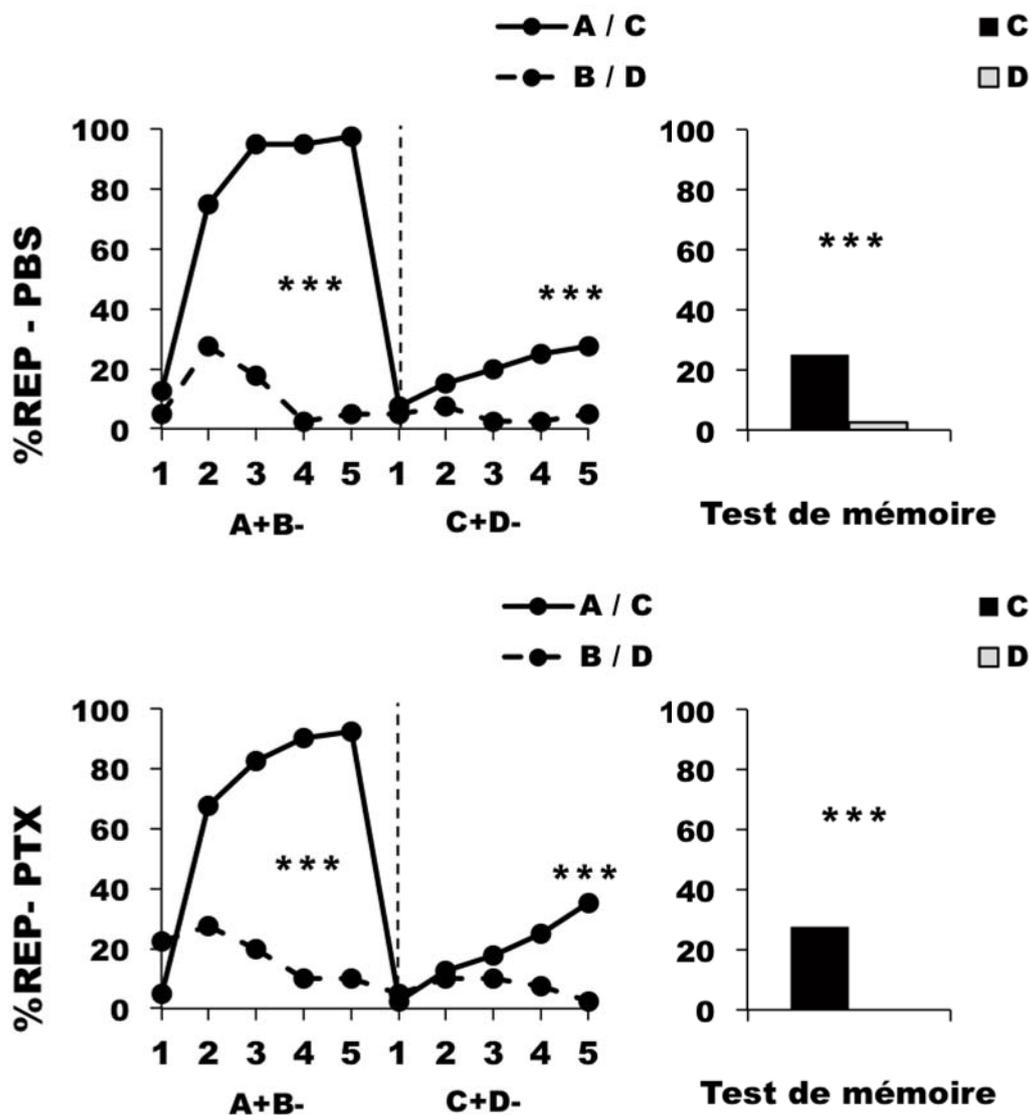


FIGURE 3.8 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel de deux phases de discrimination simples ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement (A / C : ligne pleine; B / D : ligne en tirets) et du test de rétention à une heure (C : barre noire; D : barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 40$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 40$, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l’étape d’injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

concernant l'odeur récompensée à celle non récompensée en fin de conditionnement d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, interaction odeur x essais ; PBS : $F_{4,39} = 3,05$; $P = 0,02$; PTX : $F_{4,39} = 5,05$; $P < 0,001$) et le test post-hoc de Tukey appliqué lors du dernier essai ($P < 0,001$ à l'essai 5 pour les deux groupes) ainsi que lors du test de rétention de mémoire (PBS : $F_{1,39} = 11,32$; PTX : $F_{1,39} = 13,21$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Les deux groupes présentent également des profils d'acquisition similaires lors de la seconde phase (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{2,77} = 0,04$; $P > 0,05$).

Catégorisation des abeilles et stratégies employées.

Les abeilles ayant été conditionnées d'après le protocole ambigu ou le protocole simple correspondant (paragraphe 3.4.1 et 3.4.2, respectivement) ont ensuite été catégorisées *a posteriori* d'après le critère d'apprentissage précédemment détaillé. Que ce soit dans le cas de l'apprentissage ambigu ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$) ou de l'apprentissage simple correspondant ($A^+ B^-$ puis $C^+ D^-$) et après injection dans les lobes, 30% des abeilles ont été catégorisées comme apprenantes et 70% comme non apprenantes pour les deux groupes, contrôle et PTX, qui ne diffèrent pas significativement entre eux (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{1,39} = 0,07$; $P > 0,05$). Dans ces proportions les deux groupes ne diffèrent pas non plus entre eux ($F_{1,39} = 0,25$; $P > 0,05$). Ceci indique d'une part que l'injection de PTX dans les lobes n'a pas d'effet

sur la capacité de résolution de l'inversion de consigne, et d'autre part que l'apprentissage n'est visiblement pas facilité malgré la levée de l'ambiguïté au cours de l'expérience contrôle, contrairement au cas de l'injection dans les calices. Ceci suggère donc que dans le cadre d'une injection au niveau des lobes les capacités d'apprentissage des abeilles sont rapidement limitées (environ 1/3 d'apprenantes à l'échelle de la population) et ce quelque soit la complexité de l'inversion de consigne proposée. L'inhibition des CP exercée par l'afférence d'un signal GABAergique semble donc être spécifiquement requise au niveau des calices et non des lobes, et de ce fait la sous-population A3-d des neurones récurrents du PCT n'apparaît pas comme nécessaire à l'apprentissage complexe contrairement aux fibres A3-v. Les deux expériences décrites précédemment dévoilent également un autre résultat majeur. En effet, les abeilles injectées au niveau des lobes verticaux, à la fois pendant l'inversion de consigne et pendant l'expérience contrôle, ont exprimé des taux de réponses globaux significativement plus bas en seconde phase de conditionnement par comparaison aux expériences correspondantes après injection dans les calices (paragraphes 3.2.1 et 3.2.2, respectivement). La baisse générale des niveaux de réponse chez ces groupes pourrait être directement imputée au lieu d'injection ciblé, à savoir que la pénétration du micro-capillaire est susceptible d'endommager les structures environnant les lobes verticaux des corps pédonculés, et particulièrement la connexion des cellules de Kenyon aux neurones et motoneurones extrinsèques émergeant des lobes. Ces afférences sont connues comme étant

impliquées dans les processus d'acquisition [112], ce qui pourrait donc expliquer les performances réduites obtenues, indépendamment d'un effet cognitif de la drogue. Néanmoins, et malgré ces taux de réponse inhabituellement bas, les deux groupes PBS et PTX montrent un profil similaire ce qui infirme une conséquence corrélée directement à l'effet pharmacologique de l'antagoniste.

Conclusion.

La fonctionnalité des neurones GABAergiques récurrents A3-v du PCT, formant une boucle entre les lobes et les calices des corps pédonculés, constitue un signal inhibiteur essentiel pour les résolutions olfactives élaborées dans le cadre de l'inversion de consigne. La neurotransmission inhibitrice semble passer exclusivement par les récepteurs-canaux ionotropiques au GABA, et ne pas être impliquée dans les apprentissages associatifs élémentaires.

Chapitre 4

Apprentissage du *Feature*

Négatif

The universe is big. It's vast and complicated and ridiculous. And sometimes, very rarely, impossible things just happen and we call them miracles.

– The Doctor, *The Pandorica Opens* - *Doctor Who*.

Le *feature* négatif constitue un second protocole d'apprentissage ambigu, qui reste jusqu'à présent moins étudié et peu connu chez l'abeille [26, 113]. Dans le cas du *feature* négatif, la nature de l'ambiguïté abordée est distincte de celle présentée dans le cas de l'inversion de consigne, puisque le lien équivoque existant entre les stimuli et le renforcement repose ici sur une même odeur qui est tour à tour renforcée ou non renforcée, et ceci en fonction du contexte olfactif qui l'implique ($A^+ AB^-$, pour revue, voir [114]), contraire-

ment à la tâche d'inversion de consigne qui présente une ambiguïté basée sur la temporalité des associations entre le renforcement et les odeurs ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$). L'expérience de *feature* négatif, elle, maintient tout au long de la tâche l'ambiguïté de valence d'une des deux odeurs utilisées [26, 113]. D'un point de vue théorique, l'ambiguïté configurale présente dans le protocole de *feature* négatif peut être résolue en utilisant trois principales stratégies cognitives. La première implique que les animaux utilisent simplement une stratégie de type élémentaire, c'est-à-dire qu'ils considèrent le mélange AB non renforcé comme étant la somme linéaire de ses composantes A et B, soit que $AB^- = [A^- + B^-]$ [19], et qu'au sein duquel chaque composant est associé séparément à la présence ou l'absence de renforcement. Dans ce contexte, l'indice critique permettant de répondre de façon appropriée à chaque essai de conditionnement constitue l'élément B [115]. Etant donné que l'élément A est porteur de l'ambiguïté, puisque présenté comme étant renforcé et non renforcé autant de fois, B agit comme un indice d'inhibition conditionné de la réponse dès lors que l'odeur A apparaît conjointement à B au sein du mélange. Le protocole proposé se réduit alors à un problème purement élémentaire, les animaux établissant leur réponse - ou leur absence de réponse - en se basant sur l'absence - ou la présence, respectivement - de l'indice B^- . Au-delà de la voie élémentaire, cette tâche admet également une résolution par une stratégie de type non élémentaire, à la condition que l'animal prenne en compte la configuration olfactive du mélange, c'est-à-dire seulement si AB est traité comme une

entité (X) partiellement ou totalement distincte de la somme additive et linéaire de ses composantes, soit que $AB^- = X^- \neq [A + B]$ [27]. Dans ce cas, l'ambiguïté portée par la composante A est résolue en considérant le mélange comme un composé existant en dehors de toute relation équivoque, puisqu'il n'est présenté exclusivement que comme un stimulus non renforcé (X^-), et indépendant des associations portées par ses composantes qui ne sont alors plus considérées comme telles. La discrimination devient alors triviale puisqu'elle revient à opposer A^+ à X^- . Enfin, la troisième possibilité consiste à traiter l'élément B comme un indicateur négatif signalant que le stimulus conditionnel A ne sera pas associé au renforcement, sans pour autant s'impliquer lui-même dans une relation associative directe avec le renforcement [114, 116].

L'objectif de cette expérience de *feature* négatif est d'étudier l'effet avéré au cours des sections précédentes de l'injection de PicROTOXINE dans les calices pendant un autre type d'apprentissage que celui de l'inversion de consigne. Ceci permettrait de vérifier que les résultats obtenus lors de ce précédent protocole n'en constituent pas des spécificités, mais peuvent être extrapolés à d'autres tâches, et ainsi évaluer dans quelle mesure les neurones récurrents candidats jouent un rôle conservé dans des problèmes cognitifs de niveau et de nature d'ambiguïté variés.

4.1 Rôle des récepteurs au GABA dans l'apprentissage appétitif du *feature* négatif.

Afin de confirmer l'implication du signal GABAergique afférent aux corps pédonculés dans les apprentissages complexes et ambigus, les abeilles ont donc été conditionnées d'après le paradigme du *feature* négatif.

4.1.1 Injection de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage appétitif du *feature* négatif.

Ce protocole, établi d'après les travaux de Chandra et Smith [26], a consisté à soumettre les abeilles injectées par la solution contrôle ($n = 55$) ou la Picrotoxine ($n = 55$) à une discrimination appétitive entre l'odeur A seule qui était récompensée par le sucre, tandis que le mélange binaire de A avec B n'était pas renforcé ($A^+ AB^-$). L'abeille doit donc apprendre à répondre par une extension conditionnée du proboscis à A et non pas à AB malgré la présence de l'élément A dans le mélange. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.1 (page 126). Après injection, l'odeur seule et le mélange ont été présentés de façon semi-aléatoire 8 fois, soit 16 essais au total. Les abeilles contrôles injectées au PBS ont correctement appris la discrimination entre A^+ et AB^- , puisque le taux de réponse à A^+ est significativement plus élevé que celui à AB^- au dernier essai de conditionnement d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,54} = 3,96$; $P = 0,04$; interaction odeur x essais :

$F_{8,54} = 7,61$; $P < 0,001$) ainsi que le test post-hoc de Tukey ($P = 0,04$ à l'essai 7 et $P < 0,001$ au dernier essai). En revanche, les abeilles injectées à la Picrotoxine n'ont pas appris la discrimination et les taux de réponse à chaque stimulus ne diffèrent pas significativement (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,54} = 0,28$; $P > 0,05$; interaction odeur x essais : $F_{8,54} = 1,52$; $P > 0,05$ pour tous les essais). Les pourcentages de réponses spécifiques lors du dernier essai de conditionnement en fonction du groupe sont représentés dans la Figure 4.2 (page 127). Cette réponse spécifique se définit comme étant le fait pour une abeille de répondre correctement, c'est-à-dire de répondre à l'odeur A^+ et non au mélange AB^- lors du dernier essai de conditionnement. La comparaison de ces pourcentages de réponses spécifiques a été effectuée d'un point de vue statistique par le suivi d'une procédure analogue au test de Dunnett [90], et montre une altération claire de spécificité d'acquisition de la tâche pour le groupe injecté à la Picrotoxine. Cette tendance est confirmée lors du test de rétention effectué une heure après, même si le groupe PBS a diminué sa réponse à A^+ (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,54} = 5,93$; $P = 0,02$; PTX : $F_{1,54} = 2,87$; $P > 0,05$). Malgré la différence de discrimination évidente démontrée entre les deux groupes, les analyses globales des profils de réponse au mélange non renforcé AB ainsi qu'à l'odeur seule A ne révèlent pas statistiquement de divergence en fonction du traitement (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; AB^- : $F_{1,54} = 0,01$; A^+ : $F_{1,54} = 2,04$; $P > 0,05$ dans les deux cas). La conclusion qui découle

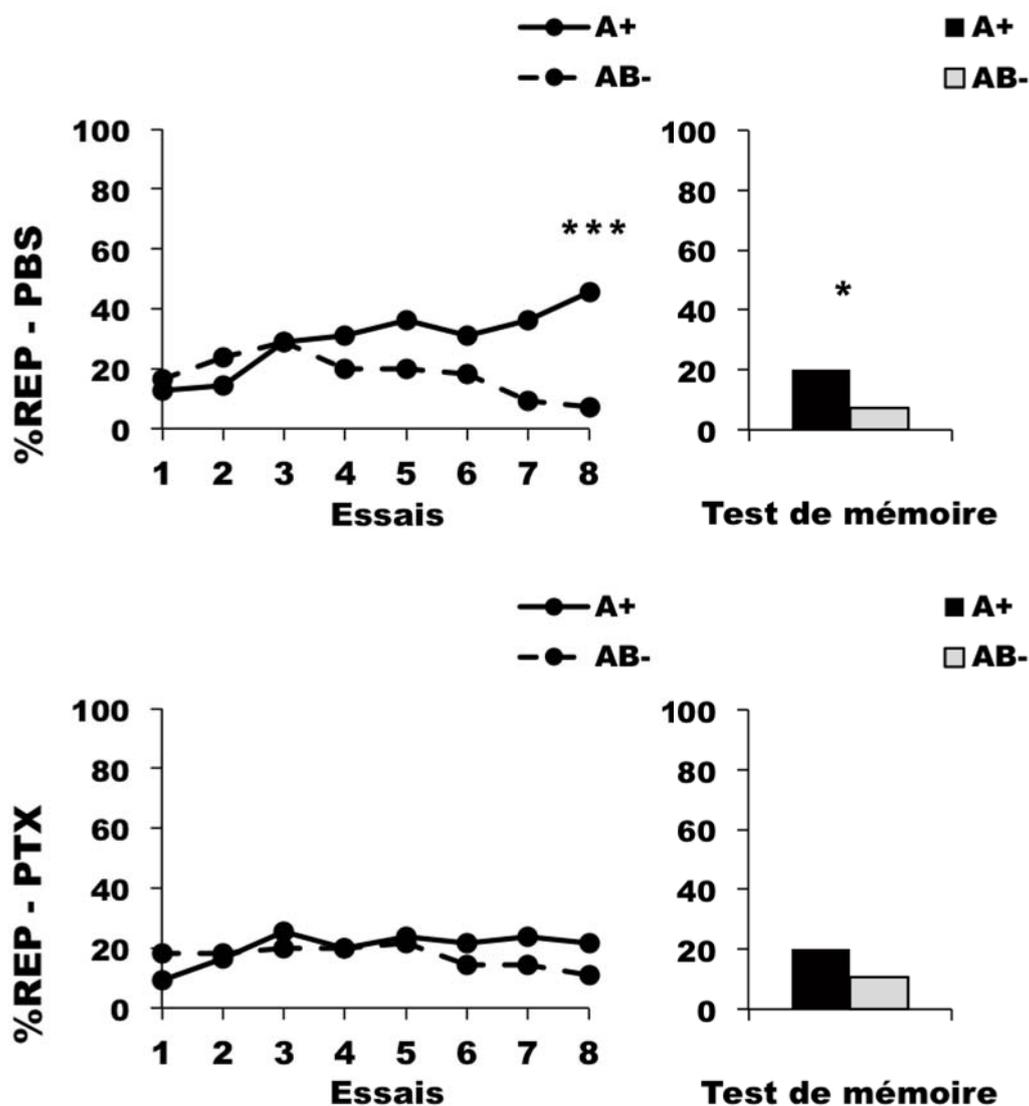


FIGURE 4.1 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l’acquisition et le rappel du *feature* négatif appétitif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire ; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 55$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 55$, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

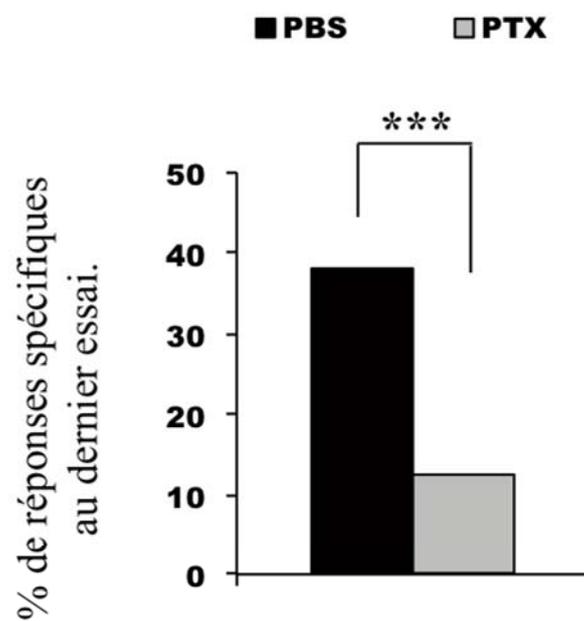


FIGURE 4.2 – Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif de la Figure 4.1 (page 126), entre le groupe contrôle injecté au PBS ($n = 55$, en noir) et celui injecté à la PTX ($n = 55$, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$.

de cette expérience implique que l'inhibition exercée par la neurotransmission GABAergique sur les calices des CP, et véhiculée par les récepteurs-canaux bloqués effectivement par la Picrotoxine, semble être également nécessaire à la résolution du paradigme de *feature* négatif.

Du fait de l'absence d'implication des récepteurs de type métabotropique dans ce phénomène lors d'une tâche d'inversion de consigne, l'effet de son antagoniste, la CGP_{54626} , n'a ici pas été réévalué au cours de ce second apprentissage.

4.1.2 Injection de PTX dans les calices avant un apprentissage appétitif rallongé du *feature* négatif.

En dépit de la différence d'acquisition entre les deux groupes qui a été démontrée dans l'expérience précédente (paragraphe 4.1.1), la performance du groupe injecté à la PTX pourrait laisser penser qu'une discrimination de l'odeur seule au mélange serait possible avec plus d'essais de conditionnement. Afin de vérifier que l'altération de l'apprentissage constatée chez ce groupe n'est pas liée à un simple retard mais correspond bien à un défaut global d'acquisition, un second conditionnement de *feature* négatif, plus long, a été proposé. Cette fois-ci, après avoir été opérées et injectées, les abeilles ont été conditionnées pendant 20 essais, soit 4 essais supplémentaires par rapport à l'expérience précédente, incluant 10 présentations semi-aléatoires de chaque stimulus. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.3 (page 130). A la fin de l'expérience, les abeilles contrôles ($n = 52$) ont appris la discrimination entre

l'odeur seule et le mélange d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,51} = 9,22$; $P < 0,001$; interaction odeur x essais : $F_{9,51} = 7,61$; $P < 0,001$) ainsi que le test post-hoc de Tukey ($P = 0,03$ à l'essai 9 et $P < 0,001$ au dernier essai). En revanche, les abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 52$) présentent des taux de réponse similaires entre les deux stimuli au cours du conditionnement d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,51} = 1,32$; $P > 0,05$; interaction odeur x essais : $F_{9,51} = 1,89$; $P > 0,05$) ainsi qu'une absence de discrimination lors du test de mémoire, contrairement aux animaux contrôles (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,51} = 10,67$; $P = 0,002$; PTX : $F_{1,51} = 0,19$; $P > 0,05$). Les deux groupes ne montrent pas de différence de réponse au mélange non renforcé (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; AB^- : $F_{1,51} = 0,72$; $P > 0,05$) dont le niveau reste très bas, mais en revanche ils diffèrent quant au taux et à la dynamique de réponse à l'odeur seule renforcée (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; A^+ : $F_{1,51} = 14,91$; $P < 0,001$). Les pourcentages de réponses spécifiques lors du dernier essai de conditionnement en fonction du groupe sont représentés dans la Figure 4.4 (page 131) et montrent effectivement une différence entre les deux groupes.

L'altération du signal GABAergique au niveau des calices par le blocage des récepteurs-canaux ionotropiques empêche donc effectivement l'acquisition du paradigme de *feature* négatif, et n'entraîne pas simplement un retard d'appren-

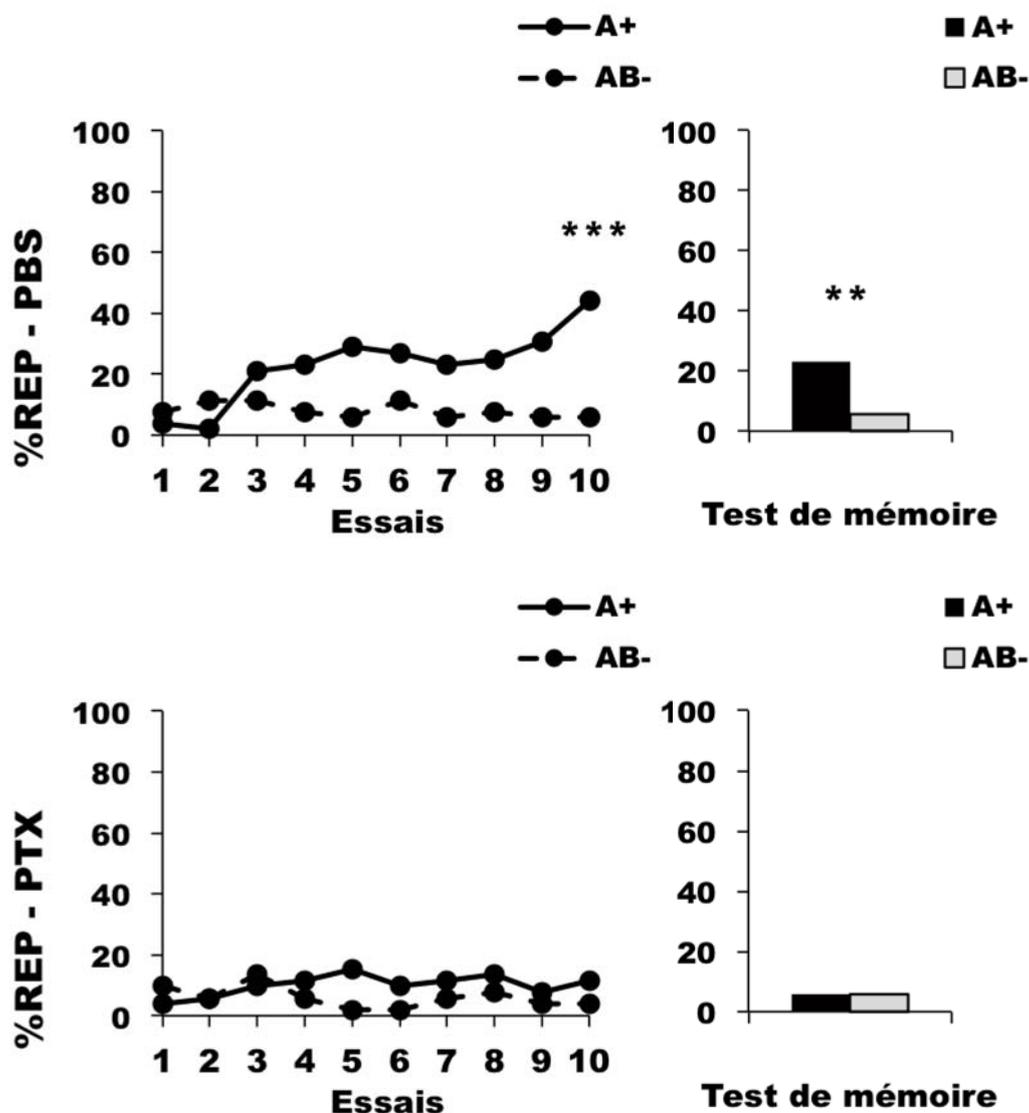


FIGURE 4.3 – L’altération de l’acquisition et du rappel du *feature* négatif appétitif (A^+ AB^-) par le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n’est pas liée à un effet retard. La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination étendue de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 52$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 52$, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

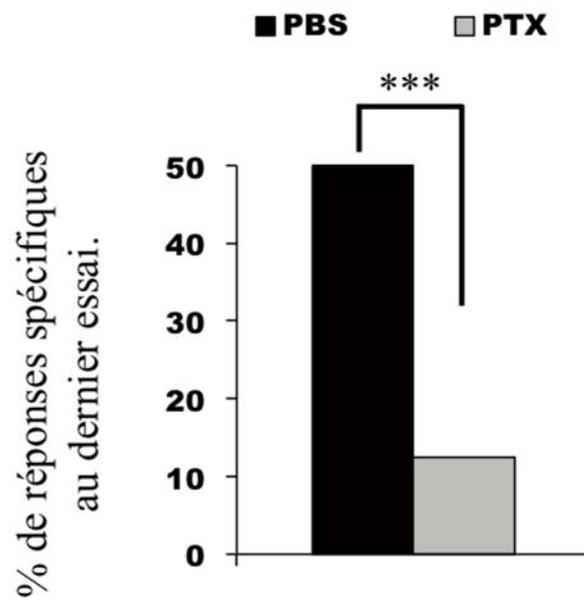


FIGURE 4.4 – Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif étendu de la Figure 4.3 (page 130), entre le groupe contrôle injecté au PBS ($n = 52$, en noir) et celui injecté à la PTX ($n = 52$, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$.

tissage comme aurait pu le suggérer l'expérience précédente.

4.1.3 Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage simple.

Lors des deux expériences décrites précédemment, concernant le protocole court (paragraphe 4.1.1) ou le protocole étendu (paragraphe 4.1.2), la discrimination olfactive était altérée par le blocage de l'information GABAergique afférente aux calices des corps pédonculés. Afin de confirmer que l'effet de l'antagoniste injecté est bien spécifique aux structures impliquées dans un apprentissage ambigu, et également que les fonctions olfactives de l'apprentissage élémentaire ne sont pas dégradées par la PTX, l'odeur A a été remplacée dans le mélange par une odeur différente (odeur C, 1-nonanol) afin de retirer l'ambiguïté de renforcement entre la présentation seule et celle associée à B. Le protocole ainsi généré ($A^+ BC^-$) ne constitue alors plus un paradigme de *feature* négatif mais revient simplement à proposer aux animaux une discrimination simple entre une odeur seule et un mélange binaire distinct, dans laquelle chaque odeur est non ambiguë. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.5 (page 134).

Après l'injection dans les calices et à l'issue du conditionnement en 16 essais identique au protocole décrit dans le paragraphe 4.1.1, les abeilles des groupes contrôle PBS ($n = 43$) et du groupe PTX ($n = 43$) ont répondu significativement plus à l'odeur A qu'au mélange BC d'après l'analyse globale

(ANOVA à mesures répétées, facteur odeur; PBS : $F_{1,42} = 69,79$; PTX : $F_{1,42} = 50,74$; $P < 0,001$ pour les deux groupes; interaction odeur x essais; PBS : $F_{8,42} = 22,51$; PTX : $F_{8,42} = 17,56$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) ainsi que le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 3 à 8) ce qui est également le cas lors du test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur; PBS : $F_{1,42} = 40,09$; PTX : $F_{1,42} = 36,52$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Les deux groupes présentent des performances d'acquisition identiques, à la fois dans l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{1,42} = 1,44$; $P > 0,05$) et également dans la comparaison des profils de courbes (ANOVA à mesures répétées, interaction groupe x essais : $F_{8,77} = 0,49$; $P > 0,05$). Contrairement aux expériences précédentes au cours desquelles les abeilles injectées par l'antagoniste étaient incapables d'apprendre une tâche complexe, ici le blocage du signal GABAergique dans les calices n'altère pas la discrimination élémentaire d'une odeur à un mélange qui ne l'inclut pas. Cette signalisation inhibitrice n'est donc visiblement pas requise pour la résolution de ce dernier cas de figure, tandis qu'elle est nécessaire, tout comme dans le cas de l'inversion de consigne, à l'apprentissage de la tâche ambiguë correspondante.

En résumé, l'inhibition des CP par l'afférence GABAergique au niveau des calices est impliquée dans la capacité des abeilles à apprendre non seulement une tâche d'inversion de consigne, mais également une tâche d'apprentissage

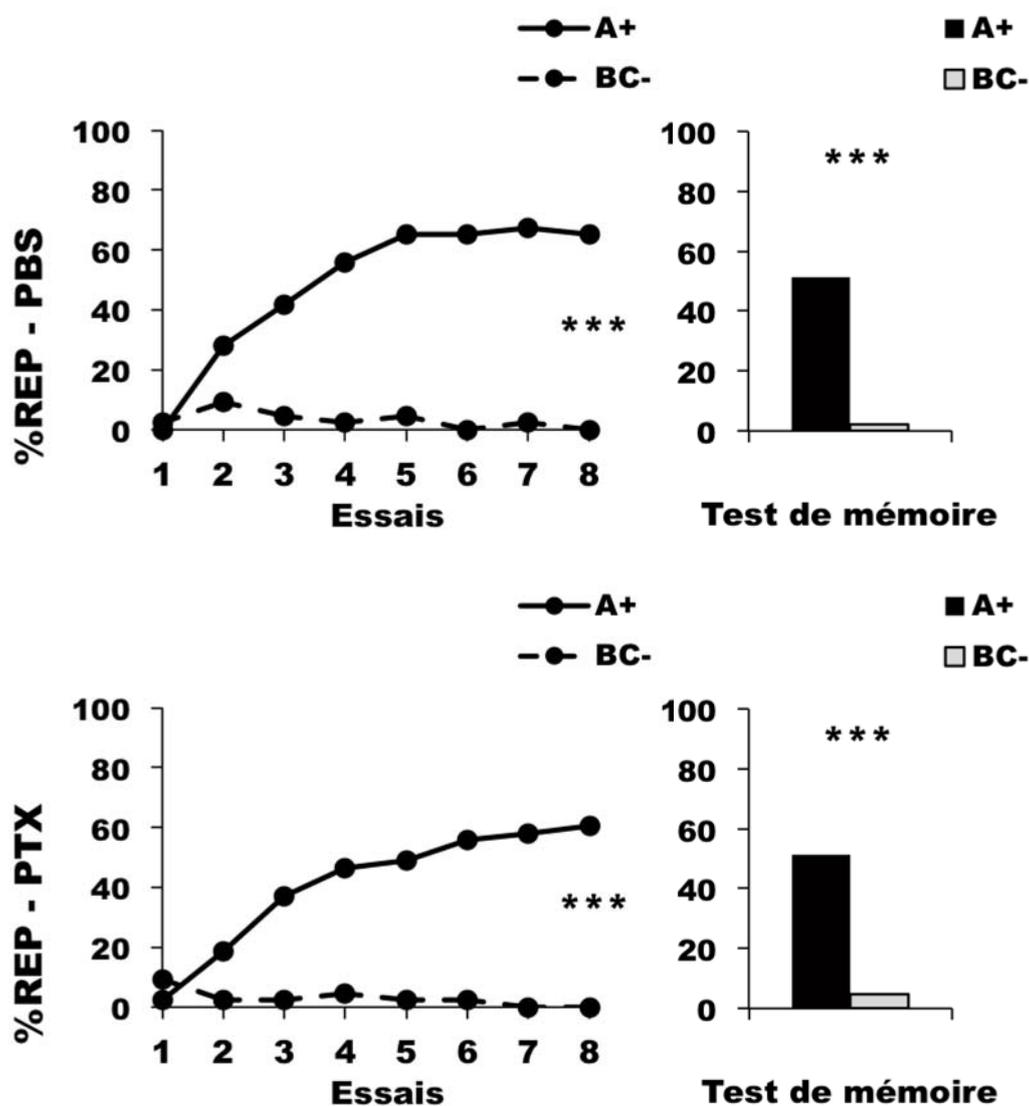


FIGURE 4.5 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel d’une discrimination de mélange simple ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire ; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 43$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 43$, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

de *feature* négatif et permet donc de résoudre des ambiguïtés de nature à la fois temporelle (inversion de consigne) et configurale (*feature* négatif) concernant les contingences de renforcement des stimuli.

4.1.4 La parcimonie dans les résolutions du problème appétitif de *feature* négatif.

Comme nouveau résultat également, les expériences précédentes de conditionnement de *feature* négatif ainsi que le contrôle non ambigu correspondant (paragraphe 4.1.1, 4.1.2 et 4.1.3, respectivement) évoquent l'utilisation d'une stratégie mixte, incluant la résolution de type non élémentaire en plus de la stratégie parcimonieuse (élémentaire) pour résoudre la tâche, puisque certaines abeilles sont toujours capables d'apprendre les protocoles ambigus (court ou étendu) y compris dans les groupes injectés à la PTX. Selon le principe de parcimonie, il est donc attendu que les abeilles aient une tendance naturelle à employer une stratégie élémentaire dans la résolution de la tâche proposée. Néanmoins, les résultats démontrent l'utilisation des deux types de résolution. Pour chacune des conditions, les individus ont été catégorisés *a posteriori* d'après le nombre de réponses à chaque odeur lors du dernier essai de conditionnement, et ont été classées comme apprenantes les abeilles ayant répondu davantage à l'odeur seule qu'au mélange ($RC_{A+} > RC_{AB-}$ au dernier essai) et comme non apprenantes celles ayant répondu de façon équivalente ou inverse ($RC_{A+} \leq RC_{AB-}$ au dernier essai). Dans le cas du protocole ambigu étendu

(paragraphe 4.1.2), 40% des abeilles du groupe contrôle sont d'après ce critère considérées comme apprenantes et 60% non apprenantes, tandis que dans le groupe injecté par l'antagoniste en revanche, seulement 10% des abeilles restent apprenantes et la part de non apprenantes est passée à 90% des animaux. Ce changement, qui se révèle évidemment significatif entre les deux groupes ($F_{1,51} = 16,65$; $P < 0,001$) indique que si l'injection de PTX bloque effectivement les processus d'apprentissages non élémentaires comme d'après l'hypothèse soutenue ici, la différence observée entre les 40% et les 10% d'abeilles apprenantes entre les deux groupes constituerait la part d'animaux utilisant une stratégie non parcimonieuse. Cela impliquerait donc qu'environ 1/4 des apprenantes (soit 1/4 de 40% = 10% d'une population naturelle d'abeilles) utiliserait préférentiellement une stratégie élémentaire qui serait maintenue en dépit de l'injection de PicROTOXINE, alors que les 3/4 restants (soit 3/4 de 40% = 30% d'une population naturelle) utiliseraient une résolution de type non élémentaire, part qui serait perdue entre le groupe contrôle et le groupe injecté par l'antagoniste. Ces proportions semblent donc indiquer que la stratégie non élémentaire, qui mène à traiter le mélange AB comme étant différent de A et de B, constitue dans le cas du protocole proposé la stratégie préférentiellement utilisée au sein d'une population naturelle pour ce type de résolution. L'autre partie du groupe contrôle (soit 60% de la population) serait constituée d'abeilles non apprenantes, c'est-à-dire incapables de résoudre la tâche, et ce par aucune des deux stratégies.

Dans le cas du protocole ambigu court (paragraphe 4.1.1), 40% des abeilles contrôles ont été catégorisées comme apprenantes ($RC_{A+} > RC_{AB-}$ à l'essai 8) et 60% comme non apprenantes ($RC_{A+} \leq RC_{AB-}$), contre 15% et 85% respectivement pour le groupe injecté à la Picrotoxine. La diminution du nombre d'abeilles capables de résoudre la tâche est statistiquement significatif entre les deux groupes ($F_{1,54} = 10,44$; $P = 0,002$). Ceci implique également qu'environ le tiers des abeilles apprenantes (40% - 15%, soit 25% des abeilles d'une population naturelle) semble avoir utilisé une stratégie non élémentaire tandis que l'autre partie (soit 15% des abeilles d'une population naturelle) semble avoir utilisé une stratégie de type élémentaire qui constitue la part d'abeilles toujours capables de résoudre le problème suite à l'injection de Picrotoxine. L'autre partie des abeilles contrôles (soit 60% de la population) est incapable de résoudre la tâche proposée de *feature* négatif.

En revanche lors de l'expérience contrôle qui ne présente plus d'ambiguïté ($A^+ BC^-$, paragraphe 4.1.3), le groupe contrôle tout comme le groupe injecté à la PTX présentent globalement des proportions d'individus équivalentes, à savoir environ 65% des abeilles considérées comme apprenantes et d'environ 35% non apprenantes dans les deux groupes qui ne diffèrent pas significativement d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,42} = 0,20$; $P > 0,05$). Ceci confirme que l'injection de PTX n'a pas d'effet sur la capacité de résolution de cette tâche contrôle.

Ces résultats semblent donc indiquer que la stratégie non élémentaire constitue

de nouveau dans le cas du protocole proposé la stratégie préférentiellement utilisée au sein d'une population naturelle. Les proportions de chaque catégorie, apprenante comme non apprenante, sont comparables entre le protocole court et le protocole étendu de *feature* négatif (40% et 60% de chaque groupe, respectivement), et qu'au sein même de la catégorie apprenante, la part d'utilisation de chaque stratégie, élémentaire et non élémentaire, est également similaire quelque soit la durée du protocole (entre 15% et 10%, et entre 25% et 30%, respectivement). Ces résultats confirment également ceux obtenus en inversion de consigne, et semblent indiquer que les abeilles résolvent également des problèmes configuratifs non seulement par une approche élémentaire qui pourrait être perçue comme étant plus parcimonieuse, mais également d'une façon non élémentaire.

4.2 Le signal GABAergique est requis au niveau des calices des corps pédonculés.

4.2.1 Injection de PTX dans les lobes au cours d'un apprentissage appétitif du *feature* négatif.

De façon symétrique à ce qui a été effectué pour la partie concernant l'inversion de consigne, des expériences ont été menées afin de confirmer que l'inhibition par le GABA au niveau des calices, véhiculée en principe par les fibres A3-v, est critique pour la résolution du *feature* négatif, alors que celle

véhiculée par les neurones innervant A3-d innervant les lobes verticaux est accessoire. Pour cela, des abeilles ont été injectées soit par le PBS ($n = 42$) soit par la PicROTOXINE ($n = 42$) dans les lobes verticaux préalablement à la tâche d'acquisition de *feature* négatif. Après avoir été opérées et injectées au niveau des lobes afin de bloquer l'afférence du signal des neurones A3-d, les abeilles ont été conditionnées par le protocole classique $A^+ AB^-$ pendant 16 essais incluant 8 présentations semi-aléatoires de chaque stimulus. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.6 (page 140). A la fin de l'expérience, les deux groupes ont appris la discrimination entre l'odeur seule et le mélange d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 6,27$; $P = 0,01$; PTX : $F_{1,41} = 8,55$; $P = 0,004$; interaction odeur x essais ; PBS : $F_{8,41} = 4,11$; PTX : $F_{8,41} = 6,39$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) ainsi que le test post-hoc de Tukey ($P = 0,04$ des essais 6 à 8 pour le groupe PBS ; $P = 0,04$ aux essais 6 et 8 et $P = 0,02$ à l'essai 7 pour le groupe PTX). Cette acquisition se manifeste également lors du test de mémoire à moyen terme (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 14,54$; PTX : $F_{1,41} = 16,40$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Les deux groupes présentent des profils de réponses identiques au mélange non renforcé ou à l'odeur seule, à la fois dans l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{8,75} = 0,48$; $P > 0,05$) et également dans la comparaison des profils de courbes (ANOVA à mesures répétées, interaction groupe x essais : $F_{8,75} = 0,94$; $P > 0,05$).

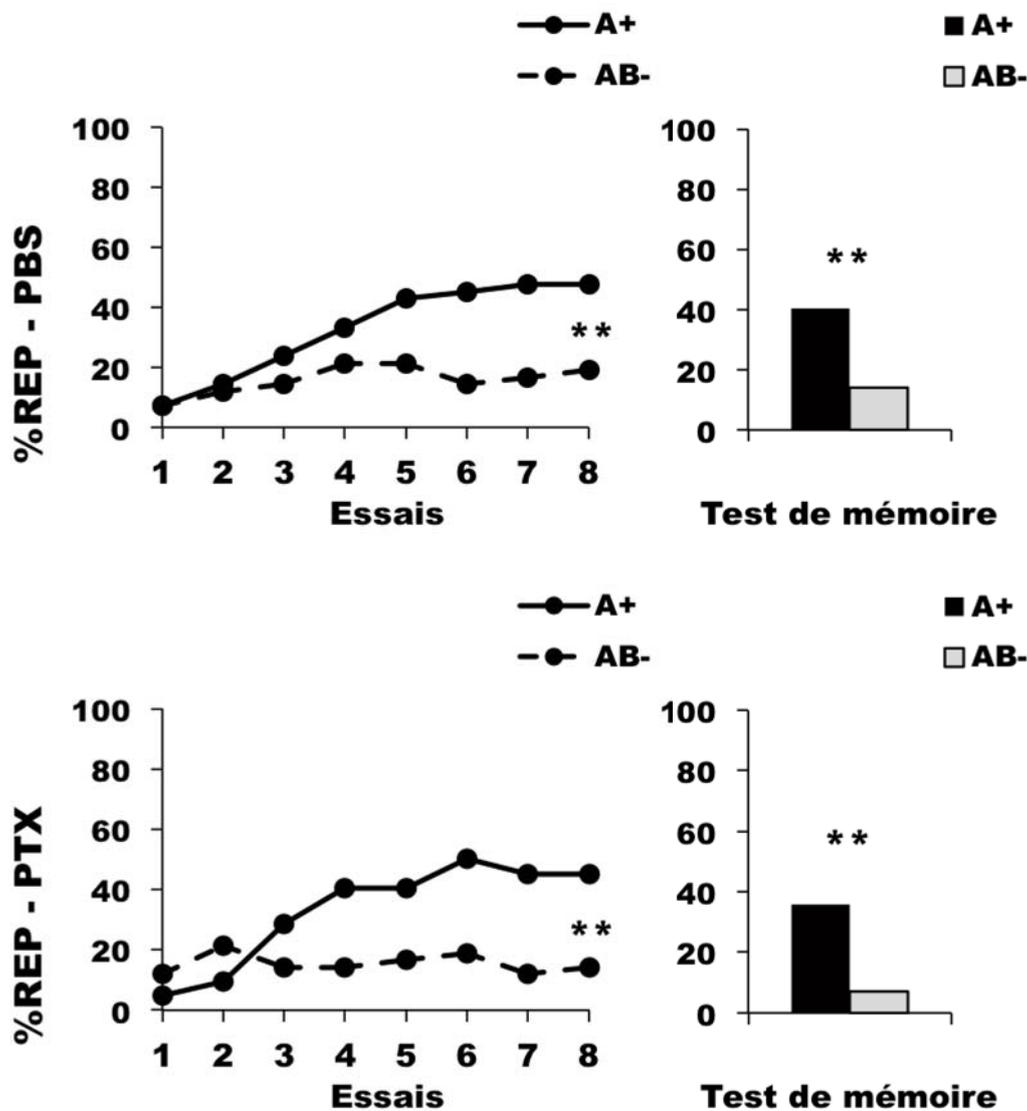


FIGURE 4.6 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel du *feature* négatif appétitif (A^+ AB^-). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire ; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 42$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 42$, en bas) au niveau des lobes verticaux. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

L'inhibition du signal GABAergique localement au niveau des lobes verticaux n'a donc pas affecté l'acquisition de ce problème, et permet de confirmer que l'intégrité des corps pédonculés n'est requise qu'au travers de la signalisation GABAergique dans les calices spécifiquement, et non dans les lobes. Ceci suggère fortement, et en complément des résultats obtenus en inversion de consigne, que les projections des neurones GABAergique récurrents nécessaires à cette résolution sont de nouveau celles constituant le groupe ventral (A3-v) qui innervent les calices à partir des arborisations dans les lobes verticaux.

4.2.2 Injection contrôle de PTX dans les lobes au cours d'un apprentissage simple.

Pour confirmer l'effet spécifique de la Picrotoxine sur le blocage des lobes et l'absence de diffusion dans l'ensemble des corps pédonculés, l'expérience contrôle a permis de lever l'ambiguïté du protocole en remplaçant l'odeur A par une odeur différente au sein du mélange, générant ainsi un paradigme non ambigu ($A^+ BC^-$). Les résultats sont présentés dans la Figure 4.7 (page 143).

Après avoir été injectées par la solution contrôle ($n = 42$) ou par la Picrotoxine ($n = 42$) au niveau des lobes verticaux, les abeilles ont été conditionnées d'après ce protocole sans ambiguïté pendant 16 essais, à la fin duquel les deux groupes ont appris avec succès la discrimination entre l'odeur seule et le mélange d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur

odeur ; PBS : $F_{1,42} = 20,43$; PTX : $F_{1,42} = 29,07$; $P < 0,001$ pour les deux groupes ; interaction odeur x essais ; PBS : $F_{8,42} = 10,90$; PTX : $F_{8,42} = 16,03$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) ainsi que le test post-hoc de Tukey (PBS : $P = 0,01$ à l'essai 4, $P = 0,06$ à l'essai 5 et $P < 0,001$ des essais 6 à 8 ; PTX : $P < 0,001$ des essais 5 à 8) ce qui est également le cas lors du test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,42} = 30,75$; PTX : $F_{1,42} = 27,88$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Les deux groupes présentent des dynamiques de réponses identiques, à la fois dans l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{8,75} = 0,91$; $P > 0,05$) et également dans la comparaison des profils de courbes (ANOVA à mesures répétées, interaction groupe x essais : $F_{8,75} = 1,18$; $P > 0,05$).

Catégorisation des abeilles.

Les abeilles ayant été conditionnées d'après le protocole ambigu ($A^+ AB^-$) ou le protocole simple ($A^+ BC^-$) correspondant (paragraphe 4.2.1 et 4.2.2, respectivement) et injectées au niveau des lobes ont ensuite été catégorisées comme apprenantes ($RC_{A^+} > RC_{AB^-}$ à l'essai 8) et comme non apprenantes ($RC_{A^+} \leq RC_{AB^-}$ à l'essai 8). Dans le cas du *feature* négatif, le groupe contrôle tout comme le groupe injecté à la PTX présentent globalement des proportions d'individus équivalentes. En effet, environ 30% des abeilles sont, d'après le critère appliqué, considérées comme apprenantes et de ce fait 70% sont non apprenantes dans les deux groupes. Plus précisément, ces proportions sont de

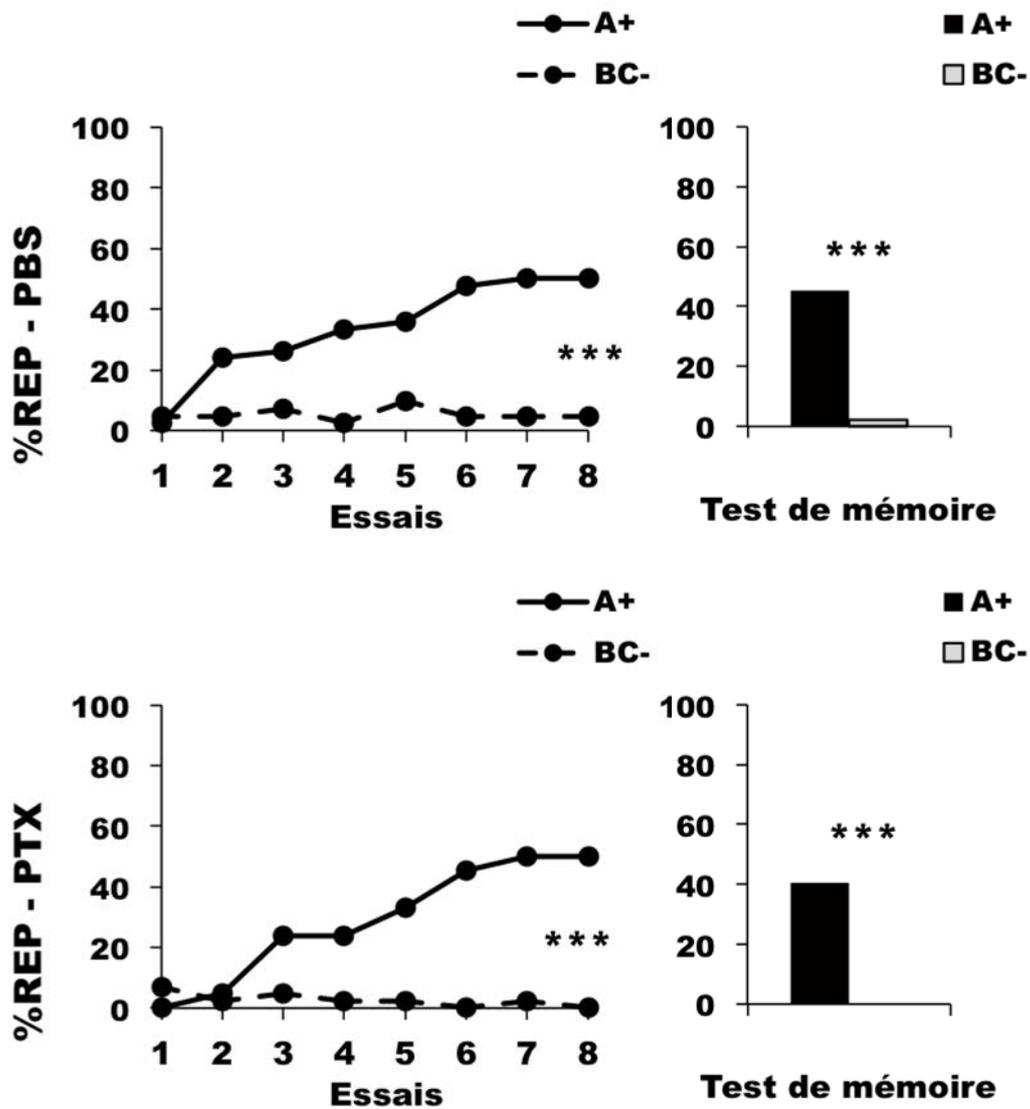


FIGURE 4.7 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel d’une discrimination de mélange simple ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 42$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 42$, en bas) au niveau des lobes verticaux. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

36% et 64% respectivement, dans le groupe PTX mais peuvent être considérées comme équivalentes à celles du groupe contrôle, d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,41} = 0,05$; $P > 0,05$). Dans le cas du protocole ne présentant pas d'ambiguïté, environ la moitié des abeilles sont apprenantes ou non apprenantes dans les deux groupes, PBS et PTX, ces proportions étant plus précisément de 45% et 55% respectivement. Les deux groupes présentent des proportions néanmoins équivalentes d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,41} = 0,18$; $P > 0,05$). Ces résultats confirment que l'injection de PTX n'a pas d'effet sur la capacité de résolution de la tâche, qu'elle soit ambiguë ou non. L'inhibition locale du signal GABAergique au niveau des lobes verticaux n'a donc pas affecté l'acquisition du problème de *feature* négatif, et permet de confirmer que l'intégrité des corps pédonculés n'est requise qu'au travers de la signalisation GABAergique dans les calices de façon spécifique et non dans les lobes. Ceci suggère donc que la contribution des neurones A3-v est nécessaire pour la résolution des discriminations non élémentaires, alors que celle des neurones A3-d est accessoire.

L'inhibition des CP assurée par le signal GABAergique semble donc être spécifiquement requise au niveau des calices et non des lobes. L'ensemble des expériences réalisées jusqu'ici confirme que la sous-population A3-d des neurones récurrents du PCT n'est manifestement pas requise à un apprentissage ambigu, que ce soit pour une tâche d'inversion de consigne ou une tâche liée au *feature* négatif.

4.3 Rôle des récepteurs au GABA dans l'apprentissage aversif du *feature* négatif.

4.3.1 Mise en évidence princeps de l'apprentissage ambigu aversif.

Cette partie a été élaborée avec l'aide expérimentale de Hélène Gauchez dans le cadre de son stage de Master 1 BioSanté.

Capacité de résolution de *feature* négatif en modalité aversive.

Les capacités d'apprentissage non élémentaire n'étaient jusqu'à présent étudiées chez l'abeille que dans le cadre des associations en modalité appétitive [21, 23, 26]. Ceci s'explique par plusieurs raisons, dont deux éléments en particulier. D'une part en raison des moindres performances obtenues chez ce modèle en modalité aversive plutôt qu'en appétitive, quand il s'agit d'apprentissages absolus, c'est-à-dire dans les protocoles les plus simples. Dans ce cas, après des essais de conditionnement multiples, les performances atteignent classiquement les 90% en fin de conditionnement appétitif tandis que les taux de réponse obtenus en aversif sont généralement plus proches de 50% [9, 10, 36]. D'autre part, le délaissement relatif concernant cette modalité d'apprentissage chez l'abeille s'explique aussi par le manque de pertinence biologique d'un protocole associant une odeur à des chocs électriques. Le problème du conditionnement du RED vient également du fait que sa mise en place est relativement

récente, contrairement au protocole du conditionnement du REP, étant donné la difficulté d'obtenir des performances correctes chez des abeilles maintenues en position allongée. Ce point sera réfuté par la suite puisque les expériences réalisées au cours de ce travail de thèse auront démontré la capacité cognitive des abeilles à résoudre des tâches élaborées en modalité aversive. Le second point qui aborde la pertinence biologique de ce protocole sera discuté plus loin.

Pour des associations aversives entre une ou des odeurs et des chocs électriques, seuls les apprentissages élémentaires de conditionnement absolu (A^+) et différentiel ($A^+ B^-$) ont été explorés jusqu'alors [9, 10]. Les travaux de Vergoz et coll. [9] ont été les premiers à mettre au point un protocole comportemental de conditionnement aversif chez l'abeille, repris par la suite par Tedjakumala et coll. [10] ayant permis d'améliorer la connaissance de ses bases neurobiologiques.

Dans ce présent travail, les abeilles ont été conditionnées d'après le protocole originel [9], néanmoins les expériences ont permis d'améliorer les conditions expérimentales, en particulier quatre paramètres critiques de l'expérience. Ces points concernent notamment *(i)* la température de la pièce qui doit rester constante et être maintenue à 25°C; *(ii)* le temps de repos de animaux après la fixation sur les supports de contention, réduite à 2 heures afin d'éviter des phénomènes de fatigue et de stress trop importants; *(iii)* l'absence d'utilisation d'une lumière artificielle qui semble altérer une bonne acquisition; et enfin

(iv) l'intensité du courant utilisé comme stimulus inconditionnel qui était plus faible que celle employée par les auteurs. En effet, des expériences préliminaires réalisées avec 5,5 volts ont généré de meilleures performances que les tests préliminaires effectués sous 7,5 volts d'après le protocole de référence, et ont justifié la modification de ce paramètre par rapport aux conditions décrites par Vergoz et coll. [9].

La Figure 4.8 (page 148) présente les performances d'acquisition et de rétention suite à un protocole de *feature* négatif en modalité aversive dans ces conditions optimales. Sur l'ensemble des 9 essais de conditionnement, les abeilles ($n = 115$) ont bien appris la tâche par une augmentation des réponses à l'odeur seule punie, et une diminution des réponses au mélange non puni (évolution de la courbe $A^+ : F_{8,114} = 2,69 ; P = 0,006 ; AB^- : F_{8,114} = 10,15 ; P < 0,001$) d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,114} = 10,82 ; P < 0,001$; interaction odeur x essais : $F_{8,114} = 7,19 ; P < 0,001$) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 8 à 9). Cette acquisition se maintient également jusque pendant le test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,114} = 30,29 ; P < 0,001$).

Cette expérience constitue le premier cas de démonstration d'apprentissage et de rétention d'une tâche ambiguë en modalité aversive chez des abeilles. Le protocole mis en place et les résultats concluants qui ont été obtenus permettent d'ouvrir un large champs de possibilités d'études dans ce domaine, et notamment d'accéder aux circuits neuronaux sous-jacents à ces mécanismes

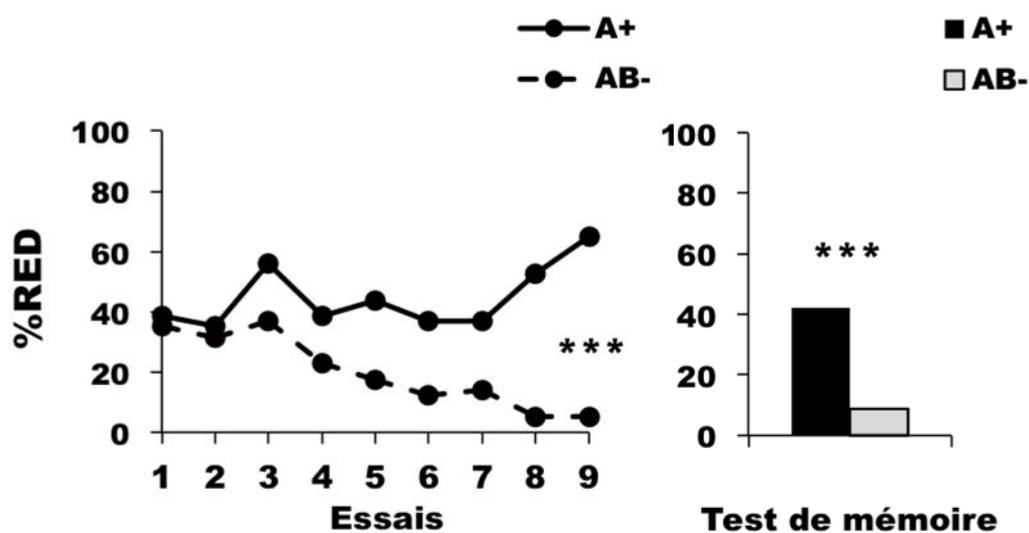


FIGURE 4.8 – Les abeilles sont capables d’apprendre une tâche de *feature* négatif aversif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe d’abeilles conditionnées ($n = 115$). ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

qui sont encore très peu connus.

Expérience contrôle du *feature* négatif en modalité aversive.

Un apprentissage simple contrôle de l'expérience de conditionnement du *feature* négatif ($A^+ AB^-$) a par la suite été mis en place, et impliquait la discrimination d'une odeur seule renforcée à un mélange binaire non ambigu ($A^+ BC^-$). L'ambiguïté était levée dans ce cas par le remplacement de l'odeur présentée seule par une odeur distincte au sein du mélange qui ne présentait alors plus de similarité. Cette discrimination est alors une discrimination élémentaire, où chaque stimulus présente une valence unique et non équivoque. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.9 (page 150). Sur l'ensemble des 9 essais de l'expérience, les abeilles ($n = 47$) ont bien appris la tâche puisque la réponse à l'odeur seule renforcée a significativement augmenté entre le début et la fin du conditionnement tandis que la réponse au mélange non renforcé a diminué (évolution de la courbe A^+ : $F_{8,46} = 3,06$; $P = 0,002$; AB^- : $F_{8,46} = 3,11$; $P = 0,002$) d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,46} = 21,96$; $P < 0,001$; interaction odeur x essais : $F_{8,46} = 6,01$; $P < 0,001$) et le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 7 à 9). Le test de mémoire effectué à une heure est également bon (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,46} = 26,52$; $P < 0,001$). La comparaison des deux groupes précédents, à savoir celui conditionné pour la tâche de *feature* négatif ($A^+ AB^-$) et celui conditionné sur le protocole élémentaire correspondant ($A^+ BC^-$), démontre que les courbes de réponse aux deux stimuli sont

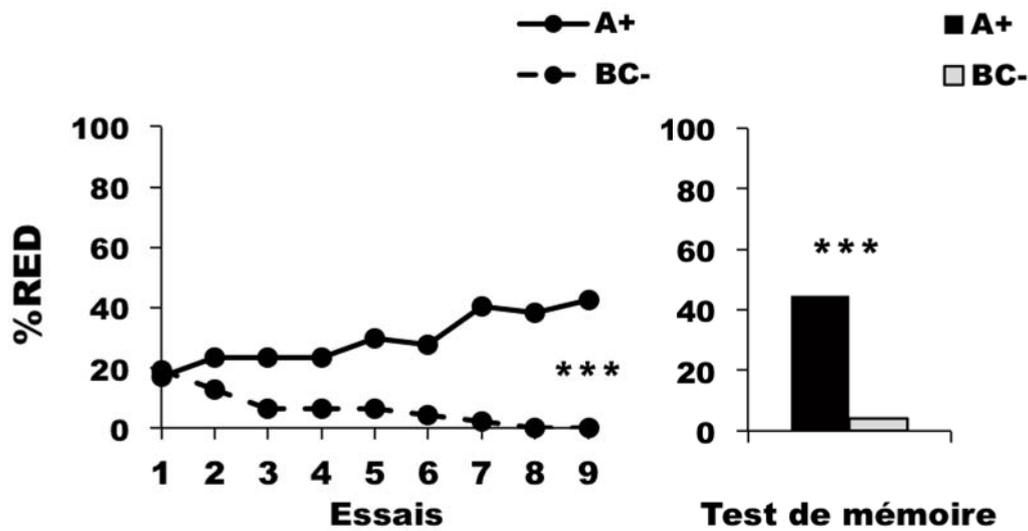


FIGURE 4.9 – Les abeilles sont aussi capables d’apprendre une discrimination de mélange simple aversive ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe d’abeilles conditionnées ($n = 47$). ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

globalement identiques dans les deux situations (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{9,152} = 1,68$; $P > 0,05$) malgré un profil légèrement différent (ANOVA à mesures répétées, interaction groupe x odeur : $F_{9,152} = 2,15$; $P = 0,03$).

Catégorisation des abeilles.

La légère dissimilarité d'apprentissage observée entre les deux conditions précédemment peut s'expliquer par une dynamique d'acquisition facilitée dans le cas de la discrimination élémentaire ($A^+ BC^-$) par rapport à la tâche de *feature* négatif, plus complexe et dont l'ambiguïté altère vraisemblablement la vitesse et la performance finale d'apprentissage. Ceci est confirmé par la catégorisation des abeilles d'après le critère d'apprentissage et la comparaison entre ces deux groupes, puisque dans le cas du protocole de *feature* négatif, 30% des abeilles ont été catégorisées comme apprenantes (et 70% non apprenantes) contre 45% (et 55% respectivement) pour le cas du protocole élémentaire. Cette variation est significative (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe : $F_{1,46} = 4,92$; $P = 0,03$) et confirme que la part d'abeilles capables de résoudre la tâche est plus élevée lors d'un apprentissage simple ($A^+ BC^-$) que lors de l'apprentissage ambigu correspondant ($A^+ AB^-$).

4.3.2 Injection de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage aversif de *feature* négatif.

L'établissement d'un protocole permettant de dévoiler la capacité d'apprentissage d'une tâche ambiguë en modalité aversive a permis par la suite d'évaluer l'implication de la neurotransmission GABAergique afférente aux CP dans la résolution de cette tâche. Pour répondre à cette question, les abeilles ont été disséquées puis injectées par la solution contrôle ou par la Picrotoxine au niveau des calices des CP, puis conditionnées sur une odeur seule renforcée et un mélange non renforcé présentés en 18 essais totaux. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.10 (page 153).

A la fin du conditionnement, les abeilles contrôles injectées au PBS ($n = 42$) ont été capables d'apprendre la tâche proposée en répondant davantage à l'odeur A punie qu'au mélange AB non puni, d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,41} = 17,93$; interaction odeur x essais : $F_{9,41} = 12,96$; $P < 0,001$) ainsi d'après le test post-hoc de Tukey ($P < 0,001$ des essais 6 à 9) et le test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,41} = 20,50$; $P < 0,001$). En revanche l'injection de Picrotoxine ($n = 42$) a significativement affecté l'acquisition puisque les abeilles de ce groupe ont répondu indifféremment aux deux stimuli lors du conditionnement d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur : $F_{1,41} = 0,38$; interaction odeur x essais : $F_{9,41} = 0,51$; $P > 0,05$), ce qui est corrélé à une absence de discrimination lors du test de mémoire (ANOVA à mesures répétées,

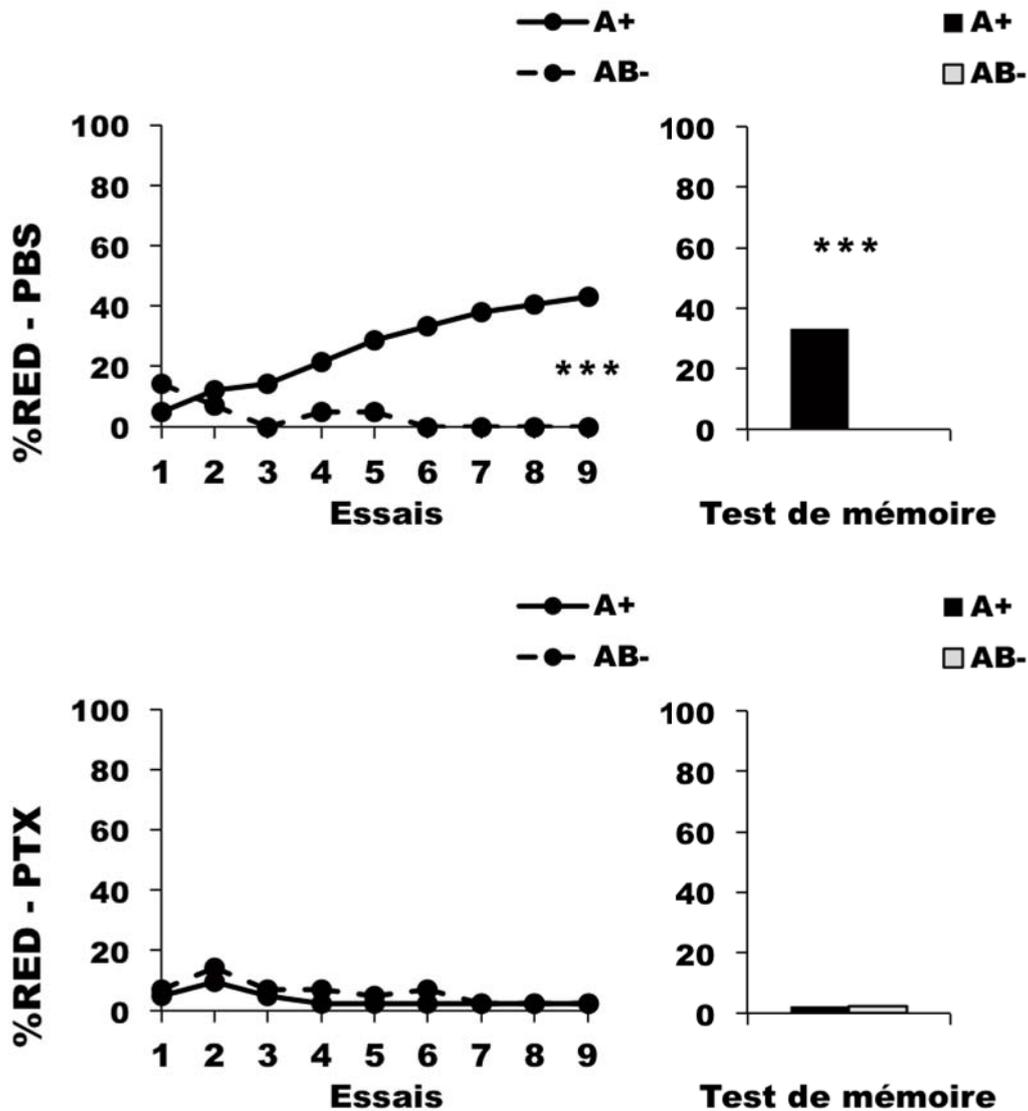


FIGURE 4.10 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l'acquisition et le rappel du *feature* négatif aversif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS ($n = 42$, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 42$, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

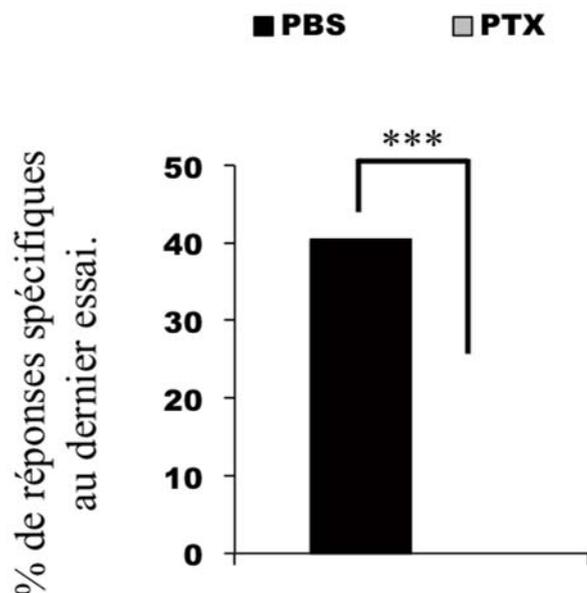


FIGURE 4.11 – Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif aversif de la Figure 4.10 (page 153), entre le groupe contrôle injecté au PBS ($n = 42$, en noir) et celui injecté à la PTX ($n = 42$, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$.

facteur odeur : $F_{1,41} = 0,47$; $P > 0,05$). Les deux groupes ne montrent pas de différence de réponse au mélange non renforcé, mais différent quant au taux et à la dynamique de réponse à l'odeur seule renforcée (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; AB^- : $F_{1,41} = 0,72$; $P > 0,05$; A^+ : $F_{1,41} = 14,91$; $P < 0,001$). Les pourcentages de réponses spécifiques lors du dernier essai de conditionnement en fonction du groupe sont représentés dans la Figure 4.11 (page 154) et montrent effectivement une différence entre les deux groupes.

Cette expérience permet de conclure quant à la nécessité de l'inhibition exercée par la neurotransmission GABAergique sur les calices des CP *via* les récepteurs de type ionotropique. Ce rôle, retrouvé également lors d'une acquisition appéti-

tive d'inversion de consigne, semble être également nécessaire et indispensable à la résolution du paradigme de *feature* négatif à la fois en modalité appétitive et aversive.

4.3.3 Injection contrôle de PTX dans les calices au cours d'un apprentissage aversif simple.

La conclusion obtenue précédemment requiert néanmoins de confirmer la spécificité de l'effet de l'antagoniste dans des apprentissages ambigus, et également que l'intégrité des processus olfactifs de base est maintenue. Pour cela, l'odeur A a de nouveau été remplacée dans le mélange par une odeur différente C afin de retirer toute l'ambiguïté au niveau de l'association entre odeur et renforcement. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.12 (page 157). Après injection et à l'issue du conditionnement, les abeilles du groupe contrôle injecté au PBS ($n = 42$) et du groupe PTX ($n = 42$) ont répondu significativement plus à l'odeur A qu'au mélange BC mélange d'après l'analyse globale (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 36,19$; PTX : $F_{1,41} = 30,65$; $P < 0,001$ pour les deux groupes ; interaction odeur x essais ; PBS : $F_{9,41} = 18,25$; PTX : $F_{9,41} = 19,47$; $P < 0,001$ pour les deux groupes) ainsi que le test post-hoc de Tukey (PBS : $P < 0,001$ des essais 5 à 9 ; PTX : $P = 0,05$ à l'essai 4, $P < 0,001$ des essais 5 à 9), ce qui est également le cas lors du test de mémoire (ANOVA à mesures répétées, facteur odeur ; PBS : $F_{1,41} = 33,87$; PTX : $F_{1,41} = 30,75$; $P < 0,001$ pour les deux groupes). Les

deux groupes présentent des profils de réponse similaires, que ce soit par rapport au mélange non renforcé (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; $AB^- : F_{1,41} = 0,10 ; P > 0,05$) et également à l'odeur seule renforcée (ANOVA à mesures répétées, facteur groupe ; $A^+ : F_{1,41} = 0,02 ; P > 0,05$).

Ce résultat confirme effectivement que les effets délétères de l'injection de PTX obtenus sur la résolution non élémentaire décrits dans la section précédente ne sont pas liés à une altération des capacités primaires d'olfaction, ni à un quelconque déficit moteur ou cognitif élémentaire.

En résumé, l'inhibition des CP par l'afférence GABAergique au niveau des calices est impliquée dans la capacité des abeilles à apprendre une discrimination de type *feature négatif*, non seulement sous la modalité appétitive par l'association entre odeur et sucre, mais également sous la modalité aversive, impliquant une association entre odeur et choc électrique. Ce rôle fonctionnel des neurones récurrents du PCT semble être joué de façon spécifique lors de problèmes nécessitant la résolution d'ambiguïtés au niveau non élémentaire, et ne paraît pas être engagé dans la résolution de problèmes non ambigus.

4.3.4 La parcimonie dans les résolutions du problème aversif de *feature négatif*.

Contrairement aux résultats obtenus en modalité appétitive, ces expériences de *feature négatif* aversives évoquent l'utilisation exclusive d'une stra-

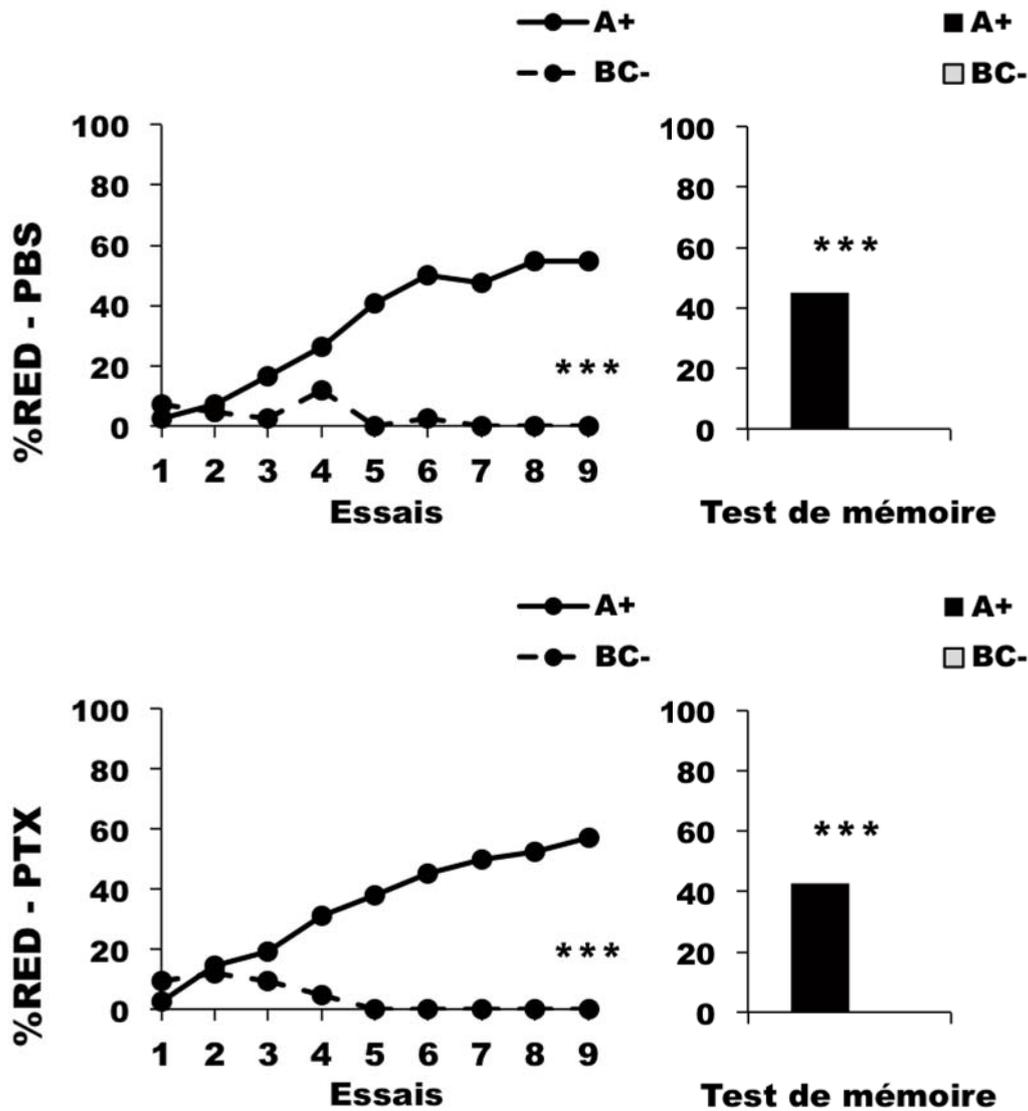


FIGURE 4.12 – Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n’altère pas l’acquisition ni le rappel d’une discrimination de mélange simple aversive ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d’extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d’une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d’abeilles injectées au PBS ($n = 42$, en haut) et du groupe d’abeilles injectées à la Picrotoxine ($n = 42$, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

tégie non élémentaire et distincte de la stratégie supposée parcimonieuse pour résoudre la tâche, qui consisterait à répondre en fonction de la présence de B seule. Au sein du groupe injecté par la Picrotoxine, plus aucune abeille ne peut être catégorisée comme étant apprenante, les taux de réponse à l'odeur seule étant systématiquement égaux ou inférieurs à ceux du mélange. Ceci exclurait donc la possibilité d'avoir des abeilles utilisant une stratégie élémentaire. Comme précédemment, l'ambiguïté peut être simplement résolue de façon élémentaire en considérant le mélange comme la somme linéaire de ses composantes ($AB^- = [A^- + B^-]$). La résolution non élémentaire en revanche s'applique à la condition que l'animal prenne en compte la configuration olfactive du mélange, c'est-à-dire si AB est traité comme une entité distincte de la somme de ses composantes ($AB^- = X^- \neq [A + B]$) et si l'élément B est traité comme un indice de non récompense qui agit comme un inhibiteur conditionné de la réponse au mélange, porteur d'une valence négative généralisée à l'ensemble du mélange. Les expériences de *feature* négatif menées en modalité appétitive ont démontré précédemment que les abeilles emploient les deux types de résolution, puisque la moitié des abeilles apprenantes semblent avoir utilisé une stratégie élémentaire et l'autre moitié la seconde stratégie, ce qui constitue un cas évident de résolution mixte par la coexistence des deux stratégies au sein de l'échantillon d'abeilles. Dans le cas des expériences en modalité aversive présentées tout au long du paragraphe 4.3.2, les animaux semblent au contraire avoir exclusivement utilisé une stratégie de type confi-

gurale pour résoudre le problème de *feature* négatif étant donné que l'injection de Picrotoxine dans les calices élimine totalement le maintien d'abeilles apprenantes en comparaison au groupe contrôle, au sein duquel la moitié du groupe a appris effectivement la discrimination proposée. En effet, 45% des abeilles contrôles ont été catégorisées comme apprenantes ($RC_{A+} > RC_{AB-}$ à l'essai 8) et 55% comme non apprenantes ($RC_{A+} \leq RC_{AB-}$ à l'essai 8), contre 0% et donc 100% des animaux respectivement, pour le groupe injecté à la Picrotoxine. La diminution drastique du nombre d'abeilles capables de résoudre la tâche est évidemment significative entre les deux groupes ($F_{1,41} = 30,75; P < 0,001$) et peut être spécifiquement attribuée à l'altération des capacités de résolution non élémentaire d'après l'hypothèse que l'injection de Picrotoxine dans les calices empêche le fonctionnement de la boucle de rétrocontrôle impliquée dans ce mécanisme. En revanche lors de l'expérience contrôle qui ne présente plus d'ambiguïté ($A^+ BC^-$), le groupe contrôle tout comme le groupe injecté à la PTX présentent globalement des proportions d'individus équivalentes, à savoir environ 55% des abeilles considérées comme apprenantes et d'environ 45% non apprenantes dans les deux groupes qui ne diffèrent pas significativement d'après l'ANOVA à mesures répétées (facteur groupe : $F_{1,41} = 0,05; P > 0,05$), ce qui confirme que l'injection de PTX n'a pas d'effet sur la capacité de résolution de cette tâche.

Ces résultats impliquent donc que sur une population naturelle d'abeilles, environ la moitié des individus serait apte à résoudre une tâche de *feature* négatif

en modalité aversive, et ce exclusivement sous une stratégie de type non élémentaire, puisque l'altération des capacités de ce type par l'injection de PTX dans les calices empêche totalement la résolution.

Conclusion.

Tout comme pour l'inversion de consigne, les neurones récurrents A3-v du PCT semblent véhiculer le signal inhibiteur indispensable pour la résolution olfactive de *feature* négatif et appétitif. Ces neurones GABAergiques ne sont en revanche pas impliqués dans les apprentissages associatifs plus simples correspondants.

Chapitre 5

Discussion Générale

In my experience there is no such thing as luck.

– Obi-Wan Kenobi, *Star Wars*.

5.1 Exploration des capacités cognitives chez l'abeille.

Ce travail de thèse a permis de révéler le rôle fonctionnel de circuits neuronaux particuliers impliqués spécifiquement dans la résolution de tâches cognitives ambiguës, les neurones récurrents A3-v du tractus protocérébro-calical (ou neurones du PCT) chez l'abeille. Nous avons démontré que ces structures sont dédiées et indispensables à l'expression des capacités d'apprentissage et de mémoire de problèmes associatifs olfactifs ambigus, à savoir l'inversion de consigne ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$) et le *feature* négatif ($A^+ AB^-$), tant en mo-

dalité appétitive par des associations entre odeur et récompense sucrée qu'en modalité aversive impliquant des associations entre odeur et chocs électriques. Le blocage de l'afférence inhibitrice des neurones du PCT sur les corps pédonculés, *via* des injections locales d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques au GABA, a démontré que les facultés de résolution étaient fortement altérées. Ces expériences ont de ce fait fourni une explication mécanistique à l'implication de la fonction des corps pédonculés dans l'acquisition et la rétention de l'inversion de consigne et du *feature* négatif. La spécialisation de certaines aires cérébrales, et notamment de certaines sous-populations de neurones (dans le cas particulier de l'abeille les neurones récurrents A3-v) dans des apprentissages de complexité variée semble donc constituer un principe général du système nerveux central des animaux. Il a en effet été démontré chez le mammifère que l'hippocampe constitue une structure dispensable dans le cadre de discriminations élémentaires, mais qui est en revanche requise - avec le système cortical - pour les formes d'apprentissage ambiguës [117, 118].

Historiquement, les corps pédonculés sont des structures centrales du cerveau de l'insecte fortement associées à des fonctions d'acquisition et de rappel des mémoires sensorielles [13, 14, 119, 120]. Les différents circuits véhiculant les informations sensorielles convergent en effet dans ces structures [11] qui constituent alors des centres intégratifs multi-sensoriels de haut niveau, puisqu'il a été démontré, en plus de ce travail de thèse, qu'elles sont requises dans les formes d'apprentissages non élémentaires impliquant des relations très pré-

cises entre les modalités [21]. Leur fonction, en revanche, n'est pas nécessaire pour résoudre des discriminations olfactives élémentaires (de type $A^+ B^-$ par exemple) [46, 48], comme l'ont démontré des expériences de lésions développementales des CP par l'emploi de l'Hydroxyurée qui bloque les processus de divisions cellulaires [46, 47]. Ces abeilles lésées présentent en effet des performances intactes dans le cadre de protocoles simples, mais se révèlent incapables de résoudre des problèmes plus élaborés tels que le *patterning* négatif ($A^+ B^+ AB^-$), ce qui suggère que contrairement au cas des discriminations de type non élémentaire, ces structures ne sont pas nécessairement importantes pour l'élaboration d'associations simples et linéaires [46].

L'ensemble des études réalisées depuis des dizaines d'années, et ayant mis en évidence l'importance des CP dans les processus d'apprentissage et de mémoire, n'est cependant pas remis en cause par la démonstration faite que ces structures ne sont pas indispensables aux problèmes élémentaires. En effet, les résultats obtenus dans ce sens lors de ce travail de thèse, ainsi que ceux issus d'autres études, s'expliquent par le fait que les abeilles utiliseraient différentes stratégies pour mémoriser les informations, mais essentiellement que les associations entre stimuli appariés lors d'un apprentissage peuvent s'établir au sein d'autres aires cérébrales en amont des CP et en particulier au niveau des lobes antennaires [21, 46, 47]. Ces lobes antennaires reçoivent les informations olfactives en provenance des antennes, et sont composés chacun de 160 glomérules qui constituent les zones de contacts entre les terminaisons synap-

tiques des neurones antennaires et les neurones de projections qui innervent les structures supérieures, dont les corps pédonculés principalement. Les travaux de Joerges et coll. [121] ont démontré par la technique d'imagerie calcique que chaque odeur perçue par l'animal était encodée selon un profil spatial spécifique d'activation des glomérules, et que la présentation d'un mélange binaire d'odeurs générait une représentation neurale légèrement différente de la somme des profils de réponse à chacun des composants [121]. Cette propriété non additive et émergente du système olfactif est engendrée par des interactions inhibitrices entre les neurones locaux présents au niveau des glomérules, et pourrait constituer le substrat neural associé à l'émergence de l'indice unique des mélanges odorants [122]. Ainsi, les lobes antennaires pourraient assurer les discriminations élémentaires [123], tandis que les structures supérieures (CP en particulier) seraient dédiées au décodage des différences de représentations neurales ainsi générées mais non traitées au niveau des lobes. La résolution des ambiguïtés configurales entre un mélange et ses composantes, comme dans le cas des protocoles de *feature* et de *patterning* négatifs, se base ainsi probablement sur la perception de l'indice unique - propriété émergente du mélange - de façon à permettre la distinction olfactive de ce mélange par rapport à ses éléments. Cette perception ne peut donc s'opérer qu'à des niveaux supérieurs aux lobes antennaires par la comparaison des profils d'activation glomérulaires qui y sont générés, et à l'évidence par les corps pédonculés qui constituent des structures de centralisation et de traitement des informations permettant la

résolution des ambiguïtés à l'échelle des stimuli [21, 22, 47].

Les capacités de résolution complexes et élaborées représentaient jusqu'alors chez l'abeille un domaine encore peu étudié, en particulier concernant les mécanismes et les structures cérébrales sous-jacents. La plupart des travaux portent sur les processus attentionnels [124] ainsi que les apprentissages de concepts chez l'abeille [5, 125–127], qui semblent dépasser le cadre des associations linéaires élémentaires, notamment l'acquisition des relations entre objets telles que les notions de similarité / différence ou de relation de position en-dessus / en-dessous [125, 127]. D'autres études suggèrent également que les abeilles sont capables d'extraire des informations en rapport à la numérosité des objets présentés et ceci de manière indépendante à leurs caractéristiques, comme la forme, la couleur ou la taille [128].

Nous avons notamment démontré que les abeilles présentaient globalement plus de facilité dans l'acquisition des tâches simples par rapport aux tâches ambiguës correspondantes (par exemple en comparant $A^+ BC^-$ à $A^+ AB^-$, paragraphes 4.1.3 et 4.1.1, respectivement), facilité qui se manifeste au travers de la dynamique d'acquisition ou encore de la performance finale à l'issue du conditionnement. Néanmoins les abeilles ont résolu avec succès l'ensemble des tâches proposées ici, et la catégorisation des individus entre type apprenant ($RC_{SC+} > RC_{SC-}$) et type non apprenant ($RC_{SC+} \leq RC_{SC-}$) a permis de préciser l'effet des agents pharmacologiques ainsi que des stratégies cognitives qui semblent avoir été utilisées. Ces méthodes, ainsi que les précédents tra-

vaux réalisés sur l'inversion de consigne ou le *feature* négatif [26, 108, 109, 113], nous permettent ainsi de développer des conclusions quant à l'investissement cognitif mis en œuvre chez cet insecte.

5.2 Les stratégies mises en jeu dans la résolution d'ambigüités.

A l'issue de chaque expérience, il a été possible d'effectuer une analyse séparée des résultats obtenus à l'échelle de la population échantillonnée, en catégorisant les abeilles conditionnées d'après un critère d'apprentissage qui repose sur la différence de réponse entre l'odeur renforcée et l'odeur (ou le mélange) non renforcée. Une différence strictement positive indique que l'animal a répondu davantage au stimulus renforcé qu'à celui non renforcé ($RC_{SC+} > RC_{SC-}$) et suggère donc une discrimination effective résultant d'un bon apprentissage, permettant de classer ces individus dans la catégorie des apprenants. En revanche, une différence nulle voire négative, même si ce dernier cas était extrêmement rare, indique que l'abeille a répondu de façon équivalente voire inverse ($RC_{SC+} \leq RC_{SC-}$) et n'a donc pas acquis la discrimination, ce qui place alors l'individu dans la catégorie des non apprenants. La comparaison de ces taux de réponse était effectuée au dernier essai de conditionnement, à savoir : l'essai 8 ou l'essai 10 concernant les protocoles de *feature* négatif appétitifs, en version courte ou étendue respectivement ; l'essai 9 concernant

le protocole de *feature* négatif aversif; et enfin l'essai 5 de la seconde phase concernant l'inversion de consigne. Les résultats obtenus ont permis de raffiner le niveau d'analyse, habituellement restreint à l'ensemble de l'échantillon d'abeilles, et ainsi de préciser certains aspects importants de l'apprentissage en fonction du type d'individu qu'il soit apprenant ou non apprenant. Ces analyses séparées permettent ainsi d'accéder à un degré de compréhension supérieur en terme de dynamique d'acquisition et de mécanismes d'apprentissage, comme l'ont démontré les travaux de Pamir et coll. [97] quant à l'importance d'observer le comportement d'acquisition à l'échelle individuelle et non seulement à l'échelle du groupe.

L'utilisation des antagonistes des récepteurs au GABA a ainsi permis de déterminer quelles étaient la (ou les) stratégies cognitives qui ont été mises en œuvre, à savoir la stratégie élémentaire (parcimonieuse) ou non élémentaire (non parcimonieuse), en se basant sur la différence du nombre d'abeilles ayant effectivement résolu la tâche sous les différentes conditions. En effet, notre hypothèse suppose une altération des capacités non élémentaires par le blocage du signal GABAergique au niveau des calices des corps pédonculés. Si une certaine proportion d'abeilles, même faible, est toujours capable d'exprimer un apprentissage en dépit de l'injection de l'antagoniste - ce qui était le cas dans la majorité des conditions - l'hypothèse formulée permet alors d'avancer que ces animaux ont résolu le problème par l'utilisation de la stratégie parcimonieuse élémentaire, que nous avons démontré comme n'étant pas affectée par les in-

jections pharmacologiques. En revanche, la différence de proportion d'abeilles apprenantes entre le groupe injecté à la drogue et le groupe contrôle constituerait alors la part d'abeilles utilisant la stratégie non élémentaire, et perdue suite au blocage du signal GABAergique. La comparaison des deux groupes de chaque expérience permet ainsi, par déduction, d'attribuer à chacune des deux voies de résolution le pourcentage d'abeilles correspondant, et d'évaluer en théorie les variations inter-individuelles de comportement au sein d'un groupe d'abeilles, *a priori* semblables. Le principe de parcimonie implique que l'animal n'utilise préférentiellement que le minimum de causes simples pour traiter l'ensemble des stimuli congruents, ce qui implique également que la résolution d'un problème associatif rencontré reposerait sur une association linéaire et non ambiguë des stimuli, c'est-à-dire une stratégie élémentaire (se référer au premier chapitre Contexte Scientifique, paragraphe 1.1.4 ; [19,20]). Dans le cas du *feature* négatif par exemple, présentant une odeur seule A^+ contre un mélange qui l'inclut AB^- , l'ambiguïté repose sur la relation équivoque de l'odeur A par rapport au renforcement, qui ne peut être résolue qu'en considérant le contexte olfactif de l'élément seul (renforcé) ou de l'élément au sein d'une configuration de mélange (non renforcé). La théorie élémentaire implique alors que le mélange soit traité comme la somme linéaire et simple de ses composantes, soit que $AB^- = [A^- + B^-]$, où la présence de B en tant qu'inhibiteur porteur d'une valence non renforcée permet de réprimer la réponse au composé. Au contraire, la voie non élémentaire (non parcimonieuse) permettant

de résoudre l'inversion de consigne ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$) ou le *feature* négatif ($A^+ AB^-$) reviendrait dans ce cas à considérer les éléments comme des entités indépendantes dans leur association avec le renforcement, à savoir traiter les deux phases comme distinctes dans le cas de l'inversion de consigne ou encore traiter le mélange comme indépendant de ses composantes dans le cas du *feature* négatif ($AB^- = X \neq [A + B]$; [5,20,21]). Nous avons ainsi pu démontrer, en nous basant sur le postulat que le blocage du signal GABAergique empêche l'utilisation des facultés non élémentaires, que toutes les abeilles n'utilisent pas le même type de stratégie pour résoudre un problème olfactif ambigu. L'utilisation préférentielle d'une stratégie de résolution particulière ainsi que l'investissement cognitif qui y est associé semblent donc varier en fonction des conditions expérimentales et de la complexité de la tâche proposée, ou bien ne seraient visibles que parce que l'on explore des mécanismes et des paradigmes plus complexes, en particulier étant donné que la proportion d'individus utilisant une résolution de type non élémentaire est d'autant plus élevée que les protocoles sont ambigus (*feature* négatif > inversion de consigne). Les résultats démontrent alors que sur l'ensemble d'une population naturelle d'abeilles, systématiquement 40% des individus ont été catégorisés comme apprenants selon le critère d'une discrimination parfaite au dernier essai de conditionnement, et sont donc en théorie capables de résoudre un apprentissage olfactif complexe, inversion de consigne ou *feature* négatif appétitif. L'autre partie de la population (60% des individus) est catégorisée comme non apprenante et ne sera

de ce fait pas capable d'acquiescer les tâches proposées. Parmi les abeilles apprenantes, les résultats indiquent notamment que la résolution de l'inversion de consigne admet l'utilisation mixte des deux stratégies, puisque la moitié de ces abeilles ont employé la voie élémentaire (20% d'apprenantes à l'issue de l'injection de PTX) tandis que l'autre moitié semble avoir employé la voie non élémentaire ($40\% - 20\% = 20\%$ de non apprenantes supplémentaires à l'issue de l'injection de PTX), et constituent ainsi la proportion d'animaux perdue suite à l'injection de l'antagoniste dans les calices des corps pédonculés. Cette hypothèse est détaillée dans la Figure 5.1 (page 171). Dans le cas de la tâche de *feature* négatif appétitif, même si de nouveau les deux stratégies sont également utilisées, il apparaît que la voie préférentielle soit celle d'une résolution non élémentaire, puisqu'en moyenne 25 à 30% des animaux semblent avoir utilisé cette stratégie contre 10 à 15% de stratégie élémentaire, et 60% des animaux ne pouvant pas du tout résoudre le problème. Cette hypothèse est détaillée dans la Figure 5.2 (page 172). Il apparaît clairement que les abeilles n'ont majoritairement pas traité le problème de *feature* négatif selon la stratégie de type élémentaire puisque le blocage de la neurotransmission GABAergique supprime la capacité de résoudre cette discrimination ($A^+ AB^-$) tandis que la capacité de résoudre une tâche élémentaire ($A^+ BC^-$) où les stimuli n'entretiennent plus de relations ambiguës reste intacte. De plus, si les corps pédonculés confèrent une identité unique au composé AB [21, 48] comme d'après la théorie non élémentaire de l'indice unique [27, 114, 116], le

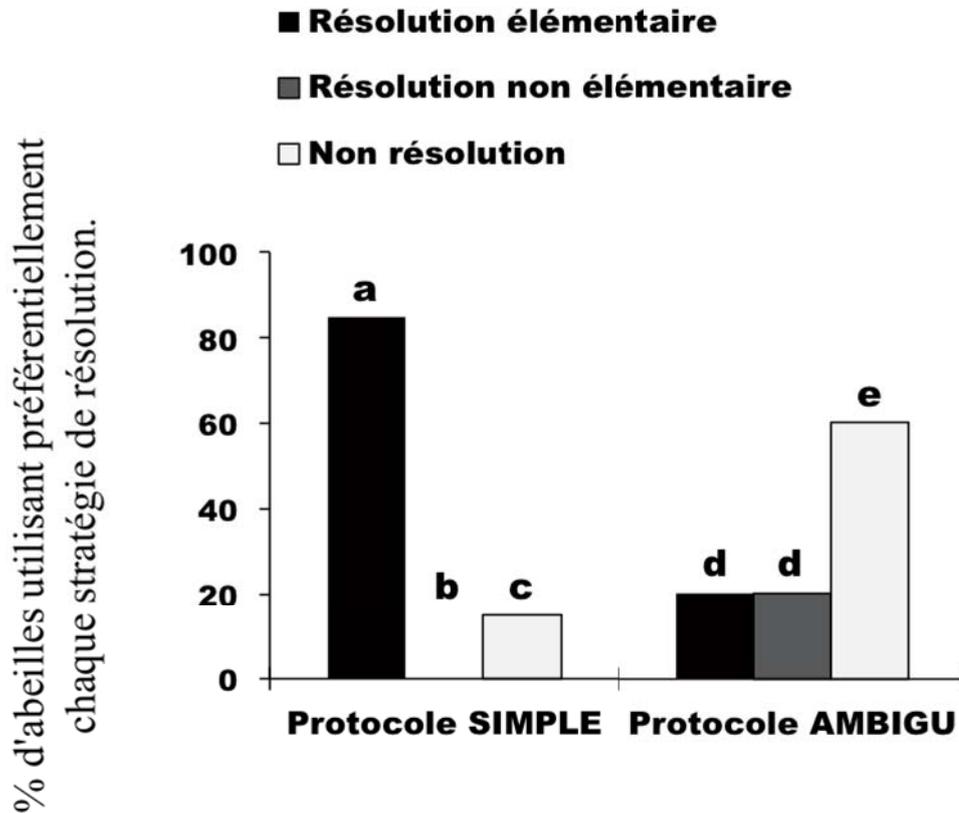


FIGURE 5.1 – Proportions d’abeilles non apprenantes (en blanc) et d’abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre de l’inversion de consigne appétitive. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ B^-$ puis $C^+ D^-$, à gauche) il apparaît que 85% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d’apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$, à droite), 40% des abeilles sont capables d’apprendre, dont 20% par la voie élémentaire et 20% par la voie non élémentaire. Les 60% restants (ou 15% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, tous les groupes sont différents entre eux ($P < 0,001$); dans le cas du protocole ambigu, le dernier groupe est différent ($P < 0,001$) et tous sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$).

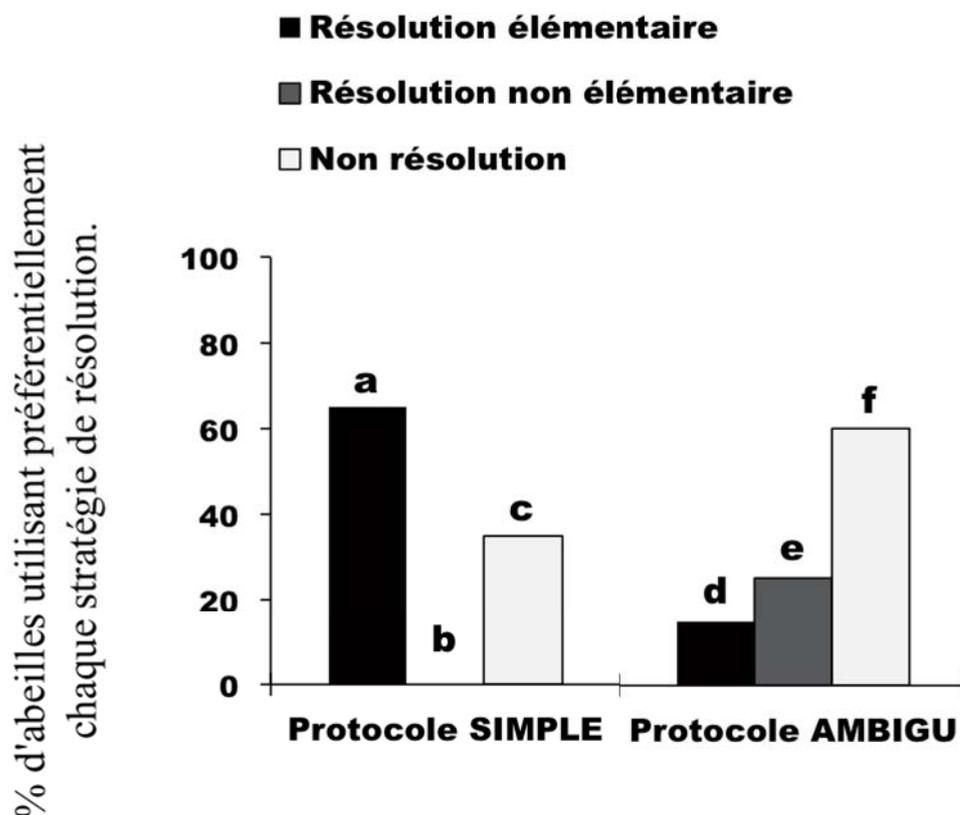


FIGURE 5.2 – Proportions d’abeilles non apprenantes (en blanc) et d’abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre du *feature* négatif appétitif. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ BC^-$, à gauche) il apparaît que 65% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d’apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ AB^-$, à droite), 40% des abeilles sont capables d’apprendre, dont 15% par la voie élémentaire et 25% par la voie non élémentaire. Les 60% restants (ou 35% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, tous les groupes sont différents entre eux ($P < 0,001$) ; dans le cas du protocole ambigu, les deux premiers groupes sont différents entre eux ($P < 0,05$) et différents du dernier ($P < 0,001$), et tous sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$).

blocage du signal GABAergique devrait logiquement supprimer la possibilité de résoudre le problème de *feature* négatif reposant sur cette stratégie. Cette stratégie est cohérente aux résultats obtenus dans nos expériences [114, 116] et permet d'expliquer que l'altération de la fonction des neurones récurrents des corps pédonculés perturbe la résolution du problème. Ainsi, des trois possibilités de stratégie expliquées dans le chapitre 4, seules les deux dernières hypothèses traitant des résolutions de type non élémentaire apportent une explication aux performances des abeilles obtenues, et soutiennent l'idée que les corps pédonculés constituent les structures cérébrales permettant d'opérer les formes résolutive non élémentaires des apprentissages ambigus.

La capacité des abeilles à apprendre cette tâche de *feature* négatif a été précédemment étudiée, à la fois sur des abeilles en libre vol [113] et sur des abeilles maintenues en contention dans le cadre du conditionnement olfactif du REP [26]. Néanmoins ces deux travaux présentent des défauts de conception expérimentale qui incitent de fait à moduler les conclusions obtenues par les auteurs concernant la démonstration de résolution de *feature* négatif dans leurs conditions. En effet, dans leur protocole de conditionnement olfactif du REP, Chandra et Smith [26] ont établi la discrimination du *feature* négatif en renforçant, d'une part, l'odeur A seule par du sucre, et d'autre part le mélange AB par une solution saline aversive, ce qui constitue un exemple typique d'erreur de combinaison de protocoles à la fois appétitif et aversif au sein d'une même expérience [12]. De ce fait la nature de la discrimination proposée aux animaux

est confuse, puisque le renforcement par le sucre implique une tâche de *feature* négatif ($A^+ AB^-$), où les symboles "+" et "-" représentent respectivement la présence et l'absence de sucre, tandis que le renforcement par la solution saline implique elle une tâche de *feature* positif ($A^- AB^+$), où les symboles "+" et "-" représentent respectivement la présence et l'absence de solution saline [26]. Les deux protocoles ainsi mélangés créent une ambiguïté conceptuelle quant à la construction de l'expérience proposée par les auteurs [12]. Abramson et coll. [113] ont récemment étudié les performances de résolution de tâches de *feature* négatif et positif dans un contexte de discrimination visuelle [113], et leur protocole présente les mêmes erreurs que précédemment. Les indices visuels renforcés étaient effectivement associés à la présence appétitive de sucre, tandis que les éléments supposés être non renforcés d'après le paradigme $A^- AB^+$ étaient en fait associés à la présence aversive de solution saline. De la même façon que pour le travail précédent [26], les discriminations de *feature* positif et négatif étaient ainsi confondues [113]. Ces deux études n'adressent pas non plus la question des stratégies cognitives utilisées par les abeilles pour résoudre les protocoles proposés, et ne permettent donc pas de déterminer si les animaux ont utilisé des stratégies de type élémentaire ou non élémentaire [26, 113].

Le protocole de *feature* que nous avons employé précédemment en version appétitive a ensuite été proposé en modalité aversive, et nos résultats ont démontré que ce paradigme renforce davantage l'utilisation préférentielle de la stratégie

considérée comme non parcimonieuse, étant donné que dans ce cas la totalité des animaux de la catégorie apprenante utilisent la stratégie non élémentaire, l'injection d'antagoniste dans les calices ayant pour effet de supprimer tout apprentissage dans la population concernée. Cette hypothèse est détaillée dans la Figure 5.3 (page 176). Il semble donc, d'une part, que le principe de parcimonie ne constitue pas une règle cognitive absolue puisque les deux voies de résolution, élémentaire (donc en théorie parcimonieuse) et non élémentaire (non parcimonieuse), sont employées au moins en proportions égales si ce n'est en favorisant la stratégie non élémentaire, à l'échelle de la population d'abeilles capables de résoudre le problème associatif rencontré.

Le cas du *feature* négatif en modalité aversive est particulièrement intéressant, puisqu'ici la seule option de résolution semble être par la stratégie configurale, c'est-à-dire de considérer le mélange AB^- comme une entité distincte de ses composantes ($AB^- \neq [A + B]$), alors que la modalité appétitive admet aussi la résolution de type élémentaire ($AB^- = [A + B]$). Cet aspect constitue une découverte remarquable, puisque les résultats obtenus sous les deux modalités peuvent être interprétés de manière différente. En effet, il a été démontré chez la drosophile que la protéine Rutabaga, une adénylate cyclase, pouvait véhiculer les traces mnésiques à la fois aversives et appétitives, et que l'expression ciblée de cette protéine au niveau des inter-neurones olfactifs de premier ordre semble être suffisante pour compenser les altérations de l'apprentissage appétitif, mais non de l'apprentissage aversif, chez des drosophiles mutantes pour

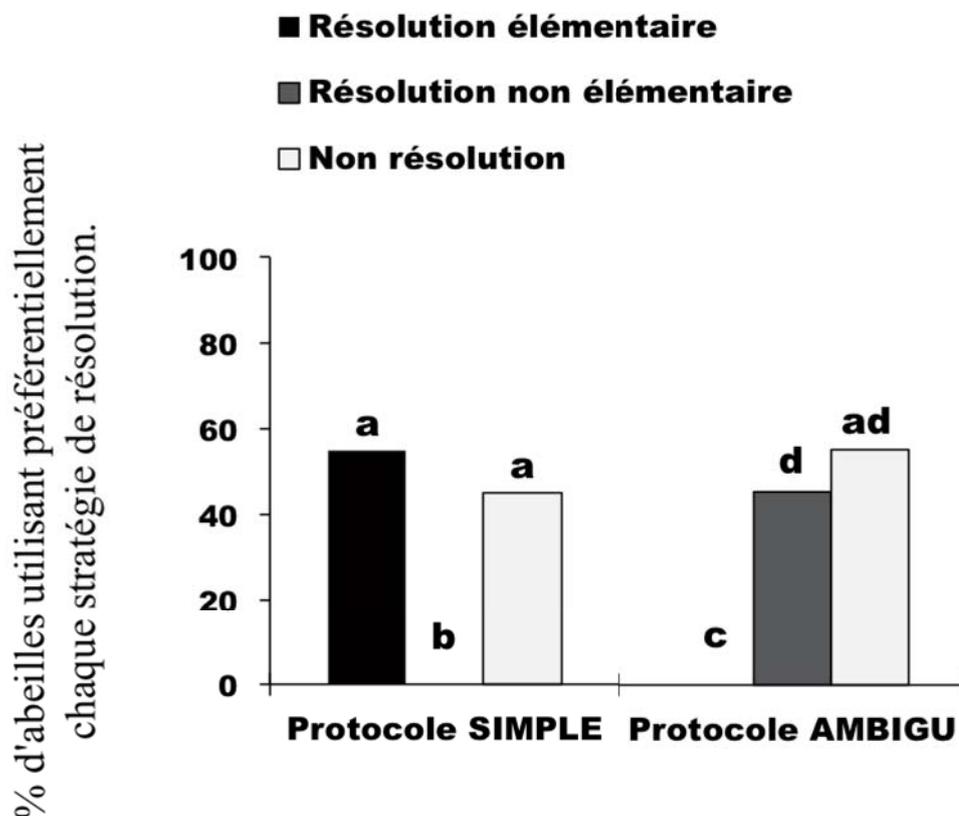


FIGURE 5.3 – Proportions d’abeilles non apprenantes (en blanc) et d’abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre du *feature* négatif aversif. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ BC^-$, à gauche) il apparaît que 55% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d’apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ AB^-$, à droite), 45% des abeilles sont capables d’apprendre et ce par la voie non élémentaire. Les 55% restants (ou 45% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, le deuxième groupe est différent ($P < 0,001$) ; dans le cas du protocole ambigu, le premier groupe est différent ($P < 0,001$) et seuls les deux premiers sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$).

Rutabaga. Il apparaît alors que malgré des mécanismes communs de plasticité, l'apprentissage olfactif appétitif semble engendrer des traces mnésiques multiples dans les neurones de projection ainsi que dans les cellules de Kenyon des corps pédonculés, tandis que la mémoire aversive n'est sauvée par Rutabaga que dans les cellules de Kenyon exclusivement, et non dans les neurones de projection en amont. Cette différence notable dans l'organisation des traces de mémoires semble alors cohérente par rapport à la représentation interne du signal de la récompense ou de la punition lors de l'apprentissage [129]. Les résultats présentés dans ce présent travail suggèrent alors, de façon similaire à ce qui a été décrit chez la drosophile, que la formation des mémoires olfactives appétitives et aversives implique séquentiellement et fonctionnellement les réseaux du lobe antennaire puis des corps pédonculés, ce qui peut être confirmé par le fait que les mélanges d'odeurs sont représentés globalement comme étant la somme des odeurs qui les composent au niveau des lobes antennaires, mais comme étant des entités non linéaires, c'est-à-dire non additives, au niveau des corps pédonculés, d'après ce que suggèrent les résultats obtenus par Honnegger et ses collaborateurs [130]. En utilisant l'imagerie calcique et la sonde GCaMP3, les auteurs ont enregistré les réponses aux odeurs au niveau des calices des corps pédonculés, et montré que le degré de séparabilité (notion de *sparseness* du codage) était constant, d'une part à travers une large gamme de stimuli comprenant des odeurs mono-moléculaires jusqu'à des mélanges odorants complexes, y compris des mélanges artificiels ou même des bouquets

naturels, et d'autre part sous un large éventail de concentrations, et générerait l'activité d'une centaine de cellules de Kenyon *in vivo*, soit environ 5% de la population neuronale totale [130]. Il est à noter de façon remarquable que chez la drosophile, le codage épars des odeurs par les corps pédonculés est supposé générer un très grand nombre de mémoires odeur-spécifiques bien précises. Des études anatomiques et physiologiques chez le criquet ont en effet identifié un neurone unique géant GABAergique, innervant le pédoncule et les lobes de chacun des corps pédonculés [59, 131]. Des projections axonales similaires semblent exister chez les neurones APL décrits chez la drosophile [132], ce qui suggère que ces neurones GABAergiques seraient effectivement susceptibles de former une boucle de rétro-contrôle négative fonctionnelle avec les corps pédonculés, et seraient alors nécessaires pour maintenir les propriétés de codage épars des odeurs dans ces structures. Les travaux de Lin et de ses collaborateurs [70] ont également montré que l'activation ou l'inhibition systématique de chacune des branches de ce circuit récurrent activait les neurones APL ou inhibait les cellules de Kenyon par ces neurones APL, respectivement [70]. Néanmoins, en perturbant la boucle cellules de Kenyon - neurones APL, les auteurs ont observé une diminution du niveau de séparabilité du codage des odeurs ainsi qu'une augmentation des corrélations inter-odeurs et une altération des capacités de discrimination d'odeurs similaires chez les drosophiles [70]. Ces résultats suggèrent alors que l'inhibition exercée par la boucle de rétro-contrôle réprime l'activité des cellules de Kenyon afin de maintenir le codage épars des odeurs

et ainsi assurer la spécificité des mémoires olfactives associées.

Une explication différente, d'un point de vue évolutif, pourrait provenir du fait que l'association du stimulus olfactif avec des chocs aversifs, porteurs d'une valence négative très forte pour l'animal, exige une réaction comportementale défensive rapide et adaptée aux stimulations nociceptives qui sont reçues. Cette nécessité vitale d'adaptation et donc d'un apprentissage efficace pourrait se traduire au niveau cognitif par une orientation évolutivement acquise du système nerveux central à mettre en œuvre directement la stratégie de résolution la plus appropriée au contexte associatif rencontré, en particulier dans le cas de conditions aversives. Lors d'un apprentissage aversif de *feature* négatif, la valeur de l'indice B qui apparaît comme un inhibiteur conditionné de la réponse pourrait être insuffisante pour compenser la valence aversive acquise de A, rendant ainsi la résolution par la voie élémentaire moins efficace. Ceci pourrait expliquer l'existence de cette préférence biologique et mécanistique observée concernant la résolution non élémentaire plus adaptée dans ce cas de figure. Cette observation pourrait également s'expliquer au regard de la circuiterie sous-tendant les apprentissages associatifs, étant donné que les neurones qui véhiculent les signaux appétitifs gustatifs ou aversifs sont distincts chez l'abeille (neurone VUMmx1 pour le sucre [56] et neurones dopaminergiques [10, 103] pour les chocs, respectivement). Les caractéristiques morpho-anatomiques et fonctionnelles de chacun de ces types de neurones pourraient alors apporter une explication aux différences de stratégies cognitives obser-

vées, notamment si la circuiterie propre aux neurones dopaminergiques facilite l'implication des neurones récurrents, et de ce fait l'utilisation d'une résolution par la voie non élémentaire associée.

Un autre élément intéressant soulevé par les résultats de catégorisation de données, mais auxquelles les expériences menées au cours de cette thèse ne permettent pas de répondre, concerne le phénomène de coexistence chez un même individu de la capacité de résolution par les deux stratégies, en fonction du contexte d'apprentissage. Les expériences ayant été menées sur des groupes d'abeilles distincts n'ont ainsi pas évalué si un même animal était par exemple capable de résoudre l'inversion de consigne par voie élémentaire et le *feature* négatif en modalité aversive par voie non élémentaire.

Néanmoins un élément permet de discriminer l'exclusivité d'une stratégie par rapport à l'autre de leur possible simultanéité. En effet, si d'après notre hypothèse l'injection de Picrotoxine génère effectivement la perte de la part d'individus pouvant résoudre par voie non élémentaire, alors les parts d'apprenantes et de non apprenantes devraient être identiques dans le cas où ces abeilles injectées seraient capables de compenser par une résolution de type élémentaire. Etant donné que les pourcentages de non apprenantes sont plus élevés dans les groupes PTX que dans les groupes contrôles, alors les deux stratégies semblent être effectivement exclusives l'une de l'autre et le système n'apparaît pas être capable de compensation de la stratégie perdue par la stratégie élémentaire chez les animaux injectés.

5.3 Utilisation de la pharmacologie lors de processus cognitifs de haut niveau.

De nombreuses expériences employant des injections d'agents pharmacologiques ont été historiquement réalisées dans le cerveau d'abeille afin d'évaluer l'implication et le rôle fonctionnel au cours de processus cognitifs de gènes, de protéines ou de circuits neuronaux particuliers [56, 133]. A l'heure actuelle, seuls les travaux de Devaud et coll. [48] ont exploré le recrutement spécifique des corps pédonculés lors d'un apprentissage de type ambigu - l'inversion de consigne - en démontrant que l'anesthésie générale de ces structures altère drastiquement les capacités de résolution des animaux injectés, et ces travaux ont amené un premier élément encourageant dans l'identification des circuits sous-jacents de ces comportements complexes.

Ce travail de thèse a consisté à injecter dans le cerveau de l'abeille au niveau d'aires distinctes des corps pédonculés, des antagonistes dirigés contre deux récepteurs du GABA, les récepteur-canaux ionotropiques et les récepteurs métabotropiques couplés à une protéine G, afin de définir le rôle respectif de chacun au cours d'apprentissage associatifs ambigus. Ces injections locales de Picrotoxine et de CGP_{54626} ont permis de bloquer significativement la neurotransmission GABAergique dans ces structures puisque l'efficacité de ces agents sur leurs cibles respectives dans des neurones d'abeille a au préalable été étudiée par d'autres auteurs [81, 83]. L'injection de ces antagonistes a été

précédée d'une vérification de doses efficaces mises en évidence par l'établissement de courbes de dose-réponse à des concentrations croissantes de drogues lors d'un apprentissage élémentaire (paragraphe 2.2.3). Les doses ainsi établies ont été utilisées par la suite pour les expériences comportementales associant des injections locales de PTX ou de CGP_{54626} au conditionnement de l'inversion de consigne ou du *feature* négatif. Ces injections ont été effectuées au sein des deux principales structures cérébrales constitutives des corps pédonculés et impliquées dans l'apprentissage et la mémoire olfactive, à savoir les calices ainsi que les lobes verticaux.

Dans le but de vérifier la diffusion de ces drogues, les injections comprenaient un pigment bleu permettant de visualiser la diffusion locale et restreinte au niveau de la zone injectée, ce qui permet d'affirmer que les effets consécutifs observés au niveau comportemental étaient bien corrélés à une action locale dans la zone cible. Par ailleurs, la différence de performance obtenue suite à des injections dans les lobes verticaux par rapport à celles faites dans les calices montrent bien l'action locale et non diffusives de ces drogues.

D'une façon générale, il semble important de considérer qu'il n'existe probablement pas qu'un seul type de récepteur au GABA ionotropique ni qu'un seul récepteur métabotropique. Les travaux effectués par Dupuis et coll. [83] suggèrent effectivement une grande diversité de composition en sous-unités fonctionnelles et en formations hétéro ou homomériques concernant les récepteurs-canaux au niveau des lobes antennaires, ce qu'il semble également probable

de retrouver au niveau des corps pédonculés. Cette diversité de composition en sous-unités pourrait constituer un élément facilitateur de la flexibilité cellulaire en réponse à différents stimuli, en fonction de la dynamique d'afférence des signaux GABAergiques. En dépit du panel de sous-unités, les études de caractérisation des courants induits par le GABA enregistrés dans les cellules des lobes antennaires révèlent des propriétés pharmacologiques typiques des récepteurs de type RDL insensibles à la Bicuculline [74, 83], et suggèrent que la majorité des récepteurs-canaux au GABA dans le cerveau de l'abeille seraient composés de complexes homomériques de sous-unités RDL.

Néanmoins, il a été observé que l'utilisation de Picrotoxine ne produisait pas une inhibition complète et totale des courants induits par le GABA dans des études *in vitro* [83], ce qui suggère l'existence, même minoritaire, d'autres types de récepteurs, principalement des récepteurs hétéromériques associant les sous-unités RDL et LCCH3, ce qui incite également à moduler les conclusions apportées dans ce présent travail par le fait de souligner que les drogues utilisées ne bloquent pas forcément de façon absolue tous les récepteurs au GABA.

Ainsi, les interprétations quant aux stratégies cognitives employées (élémentaire ou non élémentaire, paragraphe 5.2) déduites par la comparaison des groupes contrôles ou injectés à la PTX ne constituent pour l'instant qu'une hypothèse, qui pourrait être simplement liée à l'efficacité imparfaite de la drogue pour bloquer les récepteurs au GABA ciblés. La persistance d'abeilles capables

de résoudre les ambiguïtés à l'issue du blocage par la PTX, que nous avons ici attribuée à l'utilisation par ces animaux d'une résolution de type élémentaire indépendante des réseaux neuronaux ciblés, pourrait alors s'expliquer par un défaut d'action de l'antagoniste ou un manque de spécificité pour cette part de la population échantillonnée. Néanmoins, un contre-argument à cette idée concerne le fait que cette proportion d'abeilles apprenantes - en dépit de l'injection de PTX - n'est pas identique entre les différents protocoles utilisés. En effet, ces proportions d'abeilles sont globalement de 20%, de 10 à 15% et de 0% dans le cas de l'inversion de consigne, du *feature* négatif appétitif et du *feature* négatif aversif, respectivement. Si l'existence d'animaux toujours capables de résoudre l'ambiguïté malgré l'injection de PTX était effectivement due à un manque d'efficacité de blocage des récepteurs ionotropiques au GABA, il semblerait alors pertinent d'obtenir des proportions identiques quelque soit l'expérience, car cet état de fait serait en théorie directement corrélié aux propriétés pharmacologiques de la drogue, et donc indépendant du type de protocole proposé par la suite aux animaux. L'hypothèse concernant les stratégies cognitives développée dans cette thèse reposerait alors *a priori* sur des résultats effectivement fondés, et non pas sur un simple manque de spécificité de la Picrotoxine. Une méthode permettant de valider cette hypothèse consisterait alors à utiliser l'interférence par ARN, technique qui sera développée au cours du chapitre de Perspectives Générales, afin de déterminer si l'obtention d'abeilles apprenantes à l'issue de l'injection de PTX était bien

liée à l'emploi par les animaux d'une stratégie élémentaire, et non pas simplement à un problème de spécificité d'action.

Malgré le fait que la majorité des récepteurs-canaux soient visiblement formés de combinaisons homo-multimériques de sous-unités RDL, générant ainsi des éléments hautement fonctionnels sensibles à la PTX mais insensibles à la Bicuculline (BIC), d'autres associations présentent des caractéristiques pharmacologiques particulières. Ces caractéristiques concernent notamment la co-expression artificielle des sous-unités RDL et LCCH3 dans des cellules de drosophile qui aboutit à des récepteurs hétéro-multimériques insensibles à la PTX mais sensibles à la BIC [134], permettant ainsi d'attribuer spécifiquement la sensibilité à l'antagoniste utilisé ici (la PTX) à la sous-unité RDL, et la sensibilité à la Bicuculline à la sous-unité LCCH3.

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse révèlent donc le rôle fonctionnel des récepteurs-canaux au GABA comprenant de façon homo ou hétéromérique au moins une sous-unité RDL, leur conférant ainsi leur sensibilité à la Picrotoxine.

L'implication des autres types de récepteurs dans les formes complexes d'apprentissage n'a donc pas été explorée de par leur insensibilité à l'agent pharmacologique employé. Le cas des récepteurs métabotropiques au GABA a été largement moins étudié du fait de l'absence d'effet obtenue avec cet antagoniste, mais il semble également probable que leur composition a une influence décisive sur leurs propriétés, et suggère de la même façon que les effets obtenus

après injection de CGP_{54626} dépendent du type de population de récepteurs ciblés. Afin de confirmer les résultats obtenus et au vu du manque de spécificité des drogues utilisées dans le cas de l'insecte, une stratégie intéressante et nécessaire consisterait par exemple à employer une méthode de blocage par ARN interférence, qui permettrait de conforter les résultats obtenus au cours de ce travail grâce à l'utilisation de deux méthodes différentes aboutissant à des résultats compatibles. Cette perspective sera discutée plus loin.

5.4 Rôle des récepteurs au GABA dans les apprentissages ambigus.

Les travaux effectués ici ont permis de démontrer que les performances d'acquisition ainsi que de rappel obtenus pour des tâches d'inversion de consigne ou de *feature* négatif étaient nettement et spécifiquement réduites dans le cas de l'injection de l'antagoniste ciblant les récepteurs ionotropiques présents au niveau des calices des corps pédonculés, aires fortement innervées et recevant les afférences sensorielles. En revanche, les injections de Picrotoxine dans les lobes ainsi que de CGP_{54626} , ciblant les récepteurs métabotropiques, n'ont aucunement altéré l'apprentissage des problèmes proposés.

L'explication la plus simple à ces résultats consiste donc à considérer, d'une part, que la neurotransmission par le GABA est spécifiquement requise au niveau des calices, les aires d'afférence des corps pédonculés, et non au niveau

des lobes verticaux. Ceci éliminerait donc l'implication de la sous-population A3-d des neurones récurrents dans ce processus, et suggère que ce sont les neurones de type A3-v, innervant de façon récurrente les calices depuis les lobes verticaux d'après les descriptions anatomiques produites par Ganeshina et Menzel [43] ainsi que Grünewald [53] qui sont dédiés à la résolution de tâches olfactives complexes. D'autre part, il apparaît clairement que la neurotransmission GABAergique requiert spécifiquement les récepteurs-canaux de type ionotropique, étant donné que l'injection de l'antagoniste des récepteurs de type métabotropique n'a pas démontré d'effet sur l'acquisition ou la rétention d'une tâche ambiguë. Ce processus semble donc reposer sur une transmission directe et rapide de l'information inhibitrice apportée aux cellules de Kenyon par les neurones A3-v du PCT au niveau des calices des corps pédonculés, et ne semble pas être dépendante de modifications structurales à long terme passant par des protéines G couplées aux RCPG ni aux cascades de signalisation intracellulaires associées. Il a été démontré que la majorité des récepteurs composés de sous-unités RDL étaient localisés au niveau de la portion axonale des cellules de Kenyon [65] sur laquelle ont été également identifiées des synapses GABAergiques [59]. Cette observation confirme la présence d'afférences GABAergiques fonctionnelles reposant sur la neurotransmission par les récepteurs-canaux dans les corps pédonculés, et suggère un processus contrôlé d'inactivation de sous-populations précises de CK. Brotz et coll. [65] ont démontré en 1997 que la transmission GABAergique jouait un rôle majeur dans

le contrôle de l'excitabilité des cellules de Kenyon au cours des oscillations des potentiels de champs en réponse à l'odeur dans des corps pédonculés de criquet [65]. Ces assemblées de neurones dont les activités oscillatoires sont ainsi rendues cohérentes entre elles, et donc présentant des propriétés synchroniques, ont été proposées comme étant un processus clé du codage des informations olfactives [135, 136].

Nous proposons que ces représentations distribuées et temporalisées des signaux olfactifs complexes par une inhibition axonale des réseaux-clés de CK joueraient un rôle prépondérant dans le cadre des apprentissages ambigus. Ils faciliteraient en effet le codage combinatoire et la résolution des ambiguïtés des liens associatifs entre les stimuli sensoriels au sein du réseau des corps pédonculés. Cette facilitation s'exercerait par les neurones récurrents *via* l'inhibition de la réponse comportementale à des stimuli non pertinents.

5.5 Les apprentissages ambigus aversifs et appétitifs dépendent des mêmes réseaux.

Les expériences de conditionnement aversif de *feature* négatif ont constitué la première démonstration des capacités de résolution complexe élaborées chez des abeilles sous des conditions d'apprentissage nociceptif. En dépit des excellentes performances d'acquisition et de rétention obtenues [33, 137], la per-

tinence biologique de l'utilisation de chocs électriques dans le cadre d'études cognitives chez l'animal reste un élément de discussion essentiel au regard des résultats et des conclusions qui en sont tirées, bien que ce type de renforcement constitue l'élément majeur des apprentissages associatifs réalisés chez la drosophile notamment [29, 33, 137].

L'existence de relations entre un stimulus conditionnel et un stimulus inconditionnel basées sur une perception nociceptive de type électroceptive semble assez peu pertinente d'un point de vue biologique, et de ce fait il paraît délicat d'extrapoler les résultats obtenus au cadre écologique et évolutif des espèces dans leur milieu, qui rencontrent vraisemblablement des stimuli plus naturels. De nombreuses études ont été menées dans le but d'accéder aux capacités et aux mécanismes de l'apprentissage aversif chez l'animal et notamment concernant des expériences de fuite, de punition ou d'évitement chez les arthropodes, en particulier les abeilles [9, 10, 138], les drosophiles [33], les blattes [139] et les araignées [140].

Abramson a été le premier à étudier en 1986 l'apprentissage chez des abeilles soumises à des techniques aversives [138] impliquant d'une part l'odeur répulsive de l'acide formique, et d'autre part l'application d'un choc électrique sur le proboscis en contact avec une solution alimentaire, ces deux appariements ayant été à l'origine de processus associatifs révélés par le comportement acquis d'évitement des contextes concernés par les stimuli aversifs [138]. Les pre-

mières études se sont généralement révélées peu concluantes du fait de lacunes expérimentales des protocoles employés, portant notamment sur l'absence de contrôle des effets du stimulus aversif indépendamment à la contingence comportementale qui y est associée, paramètre qui peut être facilement maîtrisé dans le cas de l'utilisation des chocs électriques à l'aide d'appareils de mesure tout à fait courants.

Ces chocs électriques, en plus des expositions contrôlées à un rayon laser présentant un choc thermique comme dans le cas du *flight simulator* chez la drosophile (travaux de Martin Heisenberg), sont rapidement devenus les principaux stimuli inconditionnels employés dans ce genre d'études, puisqu'ils présentent l'avantage d'être simples à utiliser (le déclenchement et l'arrêt de la stimulation pouvant être immédiats grâce à un système d'interrupteur); leur aire d'action peut aussi être contrôlée de par un dispositif expérimental de conduction électrique adéquat. L'utilisation de ces chocs électriques dans le cadre de conditionnements associatifs est également très présente chez le vertébré, et notamment dans le cas du protocole de *fear conditioning* chez le rongeur (pour revue, voir [141]). Les effets physiologiques chez les animaux soumis aux chocs électriques lors du conditionnement, ainsi que les conséquences de ces effets sur les résultats mêmes de l'expérience, restent cependant des facteurs qu'il faut à l'évidence prendre en compte. Il semble en effet difficile de dissocier les changements comportementaux observés, qui sont congruents au protocole d'apprentissage, des modifications de l'état physique et physiologique de l'ani-

mal résultant des stimulations aversives [138].

Dans le cas d'un test en labyrinthe spatial chez le rongeur, la perte de mobilité obtenue par des effets physiques des chocs électriques peut vraisemblablement induire de faibles performances par comparaison aux animaux contrôles, performances qui pourraient partiellement s'expliquer par une réduction des capacités motrices, indépendante des conséquences comportementales associées. Ces effets collatéraux, puisqu'inévitables et inhérents au traitement aversif subi par les animaux, doivent donc être dûment pris en compte lors de la conception des dispositifs et du protocole de conditionnement, et également lors de l'interprétation des résultats, et ceci afin de limiter des conclusions erronées ou simplement trop hâtives.

Il est néanmoins possible de réduire ces effets sur l'intégrité physiologique par des précautions expérimentales et de meilleurs contrôles, en particulier concernant l'intensité du voltage appliqué aux animaux. Nous avons par exemple observé que le voltage habituellement utilisé pour le conditionnement aversif chez l'abeille de 7 V [9,10] induisait une perte de vitalité et à terme un taux de mortalité plus élevé qu'avec un voltage réduit à 5,5 V. Cette réduction permettait de maintenir un état physique acceptable, et ainsi d'observer le comportement d'acquisition de la tâche proposée. En revanche un voltage trop faible (4 V) ne semblait pas suffisant pour agir en tant que renforcement efficace, puisque dans ce contexte les abeilles n'apprenaient pas le paradigme. De précédentes études menées chez le rongeur ou chez la blatte avaient déjà démontré que

l'intensité sous- ou sur-optimale du choc électrique influençait la performance d'expression du comportement cible pendant l'apprentissage, en particulier lorsque l'intensité était trop élevée [139], ce qui pourrait être à l'origine d'un syndrome de choc induit par la répétitions de stimulations nociceptives. Ceci constitue une notion de base de la théorie de Rescorla et Wagner [19, 20] et de leur modèle de conditionnement, qui postule que l'intensité du renforcement a une incidence directe sur la courbe d'apprentissage [19, 20]. Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse suggèrent fortement que l'établissement de l'intensité optimale du stimulus inconditionnel, en particulier lorsqu'il s'agit de chocs électriques, consiste en un point d'équilibre et de compromis entre une valence suffisamment importante et un effet physiologique réduit. Le compromis obtenu permet alors non seulement la formation d'une trace associative robuste, mais également de limiter les conséquences mécanistiques de motricité notamment, indépendantes de l'apprentissage. Néanmoins, lorsqu'utilisés dans des conditions bien maîtrisées, les chocs électriques constituent des renforcements extrêmement efficaces permettant d'obtenir des performances très élevées, particulièrement chez le modèle drosophile [29, 30, 33, 110].

D'autres types de stimuli aversifs, moins agressifs et stressants que les chocs électriques, pourraient cependant être employés dans le cas des apprentissages associatifs, notamment au travers de perceptions thermiques, photoniques, mécaniques et chimiques. Ces stimuli ont été employés dans de précédentes études chez l'insecte et ont démontré leur efficacité, par exemple concernant une agi-

tation vigoureuse au vortex chez l'abeille [124, 142], un choc thermique au laser chez la punaise [143] ou la drosophile [144]. Bien que d'autres alternatives soient possibles, l'utilisation classique des chocs aversifs nous a permis d'obtenir des résultats qui ont dans leur ensemble clairement démontré que le blocage du signal GABAergique dans les calices des corps pédonculés par la Picrotoxine altérait l'apprentissage. Les modalités appétitives et aversives font appel à des circuits neuronaux en partie distincts concernant le codage du stimulus inconditionnel [10], impliquant notamment des populations de neurones octopaminergiques ou dopaminergiques respectivement, ce qui pourrait expliquer les différences observées entre les performances appétitives et aversives du protocole de *feature* négatif. Le processus résolutif des ambiguïtés inhérentes aux problèmes proposés semble être indépendant de la valeur intrinsèque de l'élément du renforcement, à savoir une valence positive ou négative, bien que les stratégies résolutive soient différentes dans chacun des cas. La conséquence en est que la *labellisation*, c'est-à-dire l'identité même du stimulus inconditionnel, apparaît comme indifférente dans l'implication des neurones récurrents du PCT, puisque ces neurones sont requis en modalité appétitive et aussi en modalité aversive, même si dans ce dernier cas ils semblent jouer un rôle absolument indispensable puisque les abeilles ne sont plus capables de résoudre la tâche après un blocage de ces neurones (paragraphe 5.2).

Nous proposons donc que leur rôle fonctionnel dans la résolution de ce type d'apprentissage repose sur une ou des propriété(s) même(s) du système olfactif,

et ce quelque soit la valeur du lien associatif dont il est question.

5.6 Intérêt écologique et évolutif des capacités cognitives.

Au delà de l'intérêt scientifique que représente ce travail de thèse, et de toutes les voies d'exploration neurobiologiques qui sont ouvertes, un soin particulier doit être apporté à replacer - et maintenir - dans leur contexte naturel toute l'étendue des capacités cognitives mises en lumière ici. Dans leur milieu naturel, les abeilles sont soumises à des tâches de butinage et des relations inter-individuelles extrêmement élaborées, du fait de la complexité cognitive et sensorielle associée notamment aux interactions de communication entre congénères et à la constance florale [8]. Si les abeilles présentent des facultés si abouties en terme de discrimination de relations ambiguës ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$; $A^+ AB^-$), il est légitime d'imaginer que ces performances sont étroitement liées aux exigences de leur mode de vie, et qu'elles sont l'expression comportementale d'un long processus évolutif ayant sélectionné les lignées les plus aptes à opérer ces types de résolutions cognitives. Les études préalablement menées sur cette espèce et interrogeant ces comportements, par l'usage de protocoles de conditionnement en laboratoires (inversion de consigne [47, 48], *feature* [26, 113], *patterning* [22, 23, 145]) ne permettent pas jusqu'à présent de recontextualiser les comportements obtenus. Le principal problème de ces

études concerne l'aspect très artificiel des protocoles employés, notamment de par l'usage d'odeurs de synthèse pures, de mise en contention, et de paradigmes qu'il est délicat d'extrapoler au milieu naturel des animaux. D'autres pistes d'étude pourraient se révéler très intéressantes à ce niveau, en proposant par exemple de résoudre des apprentissages ambigus chez des abeilles en libre vol [113,146] par l'utilisation d'indices olfactifs ou visuels proches de ceux rencontrés lors d'une route de butinage, dans le cadre d'expériences de type inversion de consigne, visant à mimer le phénomène de constance florale par la transition de deux phases de présentations de fleurs aux caractéristiques distinctes et récompensées différenciellement au cours du temps. Il apparaît également, si ces performances cognitives sont le fruit d'une pression évolutive chez les abeilles, qu'*a priori* des espèces d'insectes ne partageant pas les mêmes traits d'histoire de vie ne pourraient potentiellement pas être capables de résoudre ces types de problèmes. Il semblerait alors assez probable que les opérations mentales à l'oeuvre lors des apprentissages complexes ne puissent être réalisées que chez des espèces rencontrant des problématiques similaires au cours de leur vie, et particulièrement en terme de socialité qui semble, dans le cas de l'abeille, avoir été le moteur de l'évolution de ces comportements extrêmement élaborés. Chez la drosophile par exemple, l'existence de capacités d'apprentissage ambigu de type *patterning*, qui constitue le protocole le plus abouti en terme de complexité olfactive, reste encore débattu [29], tandis que l'inversion de consigne, moins élaborée, semble réalisable chez cette

espèce [61, 110].

Toutes les évidences recueillies jusqu'à présent portent à croire qu'il est probable, voire attendu, qu'une espèce ne sera en mesure de résoudre une tâche que si celle-ci correspond à un enjeu rencontré en milieu naturel et constitue un élément intrinsèque des caractéristiques de son évolution, puisque l'existence d'une capacité cognitive ou physiologique, quelle qu'elle soit, n'a de sens que si le cerveau est construit du point de vue morphologique et fonctionnel de telle façon à faciliter cet apprentissage par une connectique adéquate entre le circuit du SC et le circuit du SI. Cette connectique peut être basée sur un processus de sélection naturelle, mais peut également permettre de répondre à d'autres types de stimuli inconditionnels (par exemple les neurones dopaminergiques) non pertinents du point de vue biologique, voire à d'autres stimuli conditionnels en association au SI si la circuiterie le permet. La complexité du mode de vie des abeilles conforte alors l'idée qu'un certain type de circuiterie neuronale propice à ces performances cognitives, leurs étant utiles tout au long de leur vie, ait été sélectionné et développé, puisqu'il permet des performances qui sont partie intégrante de l'adaptation des abeilles aux contraintes sans cesse changeantes du milieu dans lequel elles évoluent. De la même façon, il semble donc cohérent que les drosophiles, par exemple, n'expriment pas systématiquement ce type de comportement élaboré [29], puisque ne correspondant pas à des pressions de sélection réelles pour cette espèce, en dehors de la supposition qu'une espèce puisse présenter des caractéristiques pré-existantes à leur(s)

finalité(s) écologique(s). Il serait aussi intéressant d'évaluer les performances chez des espèces d'abeilles solitaires (genres *Osmia*, *Megachile*, *Xylocopa*) dont la comparaison avec *Apis mellifera* fournirait des éléments extrêmement informatifs quant à l'interaction entre le niveau de socialité et l'existence de capacités d'apprentissage élaborées au sein d'un même ordre d'insectes. La relation entre les performances cognitives complexes et les expériences vécues par l'animal constitue également un élément d'étude très intéressant. La résolution de problèmes ambigus, bien que reposant sur des réseaux neuronaux identifiés ici, pourrait effectivement n'être accomplie que par des abeilles suffisamment âgées, c'est-à-dire expérimentées, tandis que de jeunes abeilles au système nerveux encore immature pourraient s'en révéler incapables. Cet aspect, actuellement étudié dans le cadre d'une thèse au sein du laboratoire, permettrait de déterminer le degré d'implication de l'expérience dans les performances cognitives élaborées, étant donné que toutes les abeilles utilisées lors de ce présent travail étaient des butineuses relativement âgées. Ben-Shahar et coll. [108] ont démontré en manipulant la structure de colonie (classique, en cohorte unique artificielle) ainsi que l'expérience de vol et l'âge, que l'apprentissage de l'inversion de consigne était un trait dépendant de la division du travail [108], ce qui a également été démontré par Ferguson et coll. [107]. Les auteurs ont également observé une forte composante héréditaire et génétique des variations inter-individuelles des performances, la sélection des mâles haploïdes des lignées paternelles se révélant être un facteur majeur dans le comportement

d'acquisition de la tâche dès la première génération [107]. Enfin, en plus des composantes liées à l'hérédité et au polyéthisme, la saison apparaît être un élément important de la performance, puisque Hadar et Menzel ont démontré que les apprentissages excitateurs et inhibiteurs lors de l'inversion de consigne étaient différents en fonction de la saison [106], selon que les abeilles soient issues des générations d'été ou d'hiver.

L'étude comparative des performances exprimées par des abeilles de castes ou de lignées paternelles variées constituerait dans ce contexte une voie d'exploration extrêmement stimulante pour enrichir le travail réalisé ici, en particulier dans le cas de l'inversion de consigne qui est jusqu'à présent le plus documenté dans ce domaine. Ces perspectives de travaux permettraient ainsi d'apporter aux résultats de cette présente thèse une envergure davantage écologique dans la compréhension des facultés cognitives des abeilles. Les données disponibles laissent en effet penser que les colonies d'abeilles, qui regroupent naturellement une large variété de lignées génétiques, pourraient ainsi favoriser la sélection de certaines catégories de butineuses en fonction des tâches cognitives pour lesquelles elles seraient génétiquement prédisposées [107].

Chapitre 6

Perspectives Générales

« I'm bored » is a useless thing to say. You live in a great, big, vast world that you've seen none percent of.

– Louis C.K.

Ce travail a permis de mettre en lumière l'implication des circuits neuro-naux récurrents du tractus protocérébro-calical (PCT) des corps pédonculés du cerveau de l'abeille dans la résolution d'informations sensorielles conflictuelles dans le cadre d'apprentissages olfactifs ambigus (inversion de consigne et *feature* négatif).

L'un des résultats majeurs de cette étude concerne la démonstration de capacités de résolution de *feature* négatif ($A^+ AB^-$) dans le cas du protocole aversif, protocole qui s'était jusqu'alors limité à l'étude de conditionnements simples, impliquant des relations linéaires entre les odeurs et les chocs électriques qui sont associés. Nous avons pu démontrer que les processus de résolution de type

non élémentaire mis en jeu constituait une propriété intrinsèque du système nerveux, à l'évidence indépendante des valences positives ou négatives associées au stimulus renforçant (sucre ou choc électrique, respectivement). Ces résultats, entre autres, incitent également la poursuite de l'étude commencée ici et ouvrent de nouvelles perspectives à explorer, afin de mieux comprendre et caractériser les processus cognitifs des résolutions complexes chez l'abeille.

6.1 Exploration des caractéristiques pharmacologiques du signal GABAergique.

Le blocage du signal GABAergique au niveau des calices des corps pédonculés s'est révélé être efficace et provoquer une altération des capacités cognitives dans nos expériences. Il apparaît maintenant un niveau d'analyse supplémentaire qui pourrait permettre de caractériser plus finement les propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques de cette neurotransmission inhibitrice. L'inhibition post-synaptique par hyperpolarisation membranaire générée par un signal GABAergique implique effectivement deux mécanismes distincts. D'une part, l'inhibition de type phasique, dite également synaptique, qui est sensible chez le vertébré à l'utilisation de Gabazine (SR-95531), une drogue agissant comme un antagoniste allostérique des récepteurs $GABA_A$ par fixation au site de reconnaissance du GABA des complexes du récepteur canal [147–150]. D'autre part, le signal comporte une composante tonique, dite

extrasynaptique, qui est insensible à la Gabazine mais sensible, également chez le vertébré, au L-655,708 (FG-8094), un antagoniste spécifique des sous-unités de type $\alpha 5$ des récepteurs $GABA_A$ [151, 152]. L'effet de ces antagonistes est d'induire une réduction de l'inhibition transmise par le GABA dans les neurones, par inhibition de l'influx de chlore au travers de la membrane cellulaire responsable de l'hyperpolarisation neuronale. Les effets comportementaux observés par ces études chez le rongeur [147, 148] constituent une voie d'étude intéressante pour la suite de ce travail. L'inactivation spécifique soit du courant tonique soit du courant phasique généré par le signal GABAergique, ainsi que les effets comportementaux associés, permettrait d'affiner la caractérisation de l'implication des neurones récurrents dans la résolution des tâches ambiguës chez l'abeille. Néanmoins aucune étude n'a pour l'instant établi si ces drogues, largement utilisées chez le modèle rongeur, étaient efficaces chez l'insecte. Des travaux préliminaires seraient alors nécessaires de façon à caractériser le mode d'action et l'efficacité chez l'abeille, notamment par des techniques électrophysiologiques et moléculaires, avant d'envisager ce type d'approches plus intégrées.

6.2 Remplacer la méthode pharmacologique par la technique d'interférence ARN.

Une perspective méthodologique majeure de ce travail reposerait essentiellement sur l'utilisation des techniques d'interférence par ARN, qui constituent dans ce type de contexte une approche plus spécifique que par des injections pharmacologiques d'antagonistes des récepteurs au GABA. Il serait en effet impératif de montrer les mêmes résultats obtenus ici par l'emploi d'une méthode d'inhibition du signal GABAergique différente, et en l'occurrence plus ciblée. Le mécanisme d'interférence ARN est une technique de biologie moléculaire reposant sur la dégradation d'un transcrite, notamment par l'intermédiaire de l'action d'ARN double-brin (dsARN) clivés dans la cellule en courts ARN double-brin d'une vingtaine de nucléotides (siARN) par l'enzyme Dicer (pour revue, voir [153]). Cette enzyme fait partie d'un complexe multi-protéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex* en Anglais) qui prend en charge le siARN et le conduit vers l'ARNm ciblé, qui est ensuite clivé par complémentarité de séquence par une autre enzyme du complexe. Une fois clivé, l'ARNm est alors dégradé et l'expression de la protéine associée est de ce fait inhibée dans les cellules ciblées. La technique d'interférence ARN permet alors d'engendrer des phénotypes de type perte de fonction de par la simple dégradation du transcrite d'intérêt. Chez la drosophile, pour qui l'on dispose de nombreux outils génétiques mutationnels, l'élément interférent peut être in-

roduit grâce à un transgène et produit directement par l'animal [154]. En revanche, d'autres modèles comme l'abeille ne permettent pas des applications mutationnelles aussi directes, et nécessitent l'utilisation de l'interférence ARN par des approches indirectes, notamment au travers d'injections ou par voie alimentaire. Le séquençage complet du génome de l'abeille en 2006 a néanmoins constitué un élément essentiel dans la conduite d'études génomiques chez ce modèle [155]. Les principaux transcrits ciblés par cette technique constituent généralement des récepteurs de voies de transductions du signal, dont la voie octopaminergique, étudiées dans les travaux de Farooqui et coll. [156, 157] qui constituent les premières études montrant l'utilisation de siARN et qui ont démontré le rôle des récepteurs octopaminergiques dans la formation et le rappel de la mémoire chez l'abeille. Plus récemment, d'autres auteurs ont également démontré l'efficacité de cet outil dans le cadre d'études fonctionnelles, et notamment concernant la mémoire olfactive en ciblant les récepteurs au glutamate [158–161] ou à l'acétylcholine [162]. Contrairement à la drosophile, aucune interférence de la signalisation du GABA n'a jusqu'à présent été étudiée chez l'abeille [163, 164]. Dans le cadre de cette thèse dont les résultats sont basés sur des approches pharmacologiques uniquement, peut-être imparfaites de par un manque de spécificité, l'une des perspectives les plus intéressantes concernerait alors l'utilisation de la technique d'interférence ARN, afin de bloquer plus finement la signalisation GABAergique mise en lumière. L'injection localisée dans les calices d'un siARN ou dsARN ciblant par exemple (*i*) une

enzyme de biosynthèse du GABA, la glutamate decarboxylase qui catalyse la dé-carboxylation de glutamate en GABA et CO_2 , ou encore (ii) la sous-unité RDL prédominante des récepteurs au GABA, permettrait de confirmer les résultats déjà obtenus et également d'affiner la fenêtre d'action et la localisation de l'inhibition assurée par cette neurotransmission lors d'un apprentissage ambigu.

6.3 Quelle relation entre la latéralisation et les apprentissages complexes ?

Au vu de ces résultats, de nombreux éléments restent à éclaircir et pourraient donner lieu à des études complémentaires, notamment en relation aux travaux de Rigosi et coll. [165, 166] qui ont démontré la latéralisation du codage sensoriel dans le système olfactif de l'abeille par des asymétries entre hémisphères gauche et droit du cerveau. Cette asymétrie se retrouve à la fois à l'échelle morphologique et également à l'échelle fonctionnelle dans le traitement du signal odorant par les neurones, les récepteurs olfactifs et les comportements associés [165, 167]. Cette latéralisation comportementale du processus d'olfaction [168, 169] et de la mémoire olfactive [170] pourrait également constituer un paramètre essentiel des capacités d'apprentissage ambigu tel que ceux développés ici, puisqu'il serait intéressant d'évaluer dans quelle mesure ces mécanismes cognitifs de haut niveau (l'inversion de consigne et le *feature* négatif) seraient

corrélés à un biais de latéralisation entre les populations gauche et droite des neurones récurrents des corps pédonculés.

Après un apprentissage appétitif classique, Rogers et Vallortigara [170] ont démontré par une méthode de revêtement antennaire que le rappel de la mémoire à court terme impliquait en premier lieu l'antenne droite puis secondairement l'antenne gauche, tandis que le rappel à long terme (de 6 à 24 heures) nécessitait en priorité l'antenne gauche [170]. Ce transfert du côté droit vers le côté gauche, dépendant du temps, constitue un élément de latéralisation des réseaux neuronaux similaire à ce qui est retrouvé chez les vertébrés, et suggère que les propriétés fonctionnelles de la mémoire olfactive chez un animal, vertébré ou invertébré, nécessiterait donc la latéralisation du traitement du signal et des processus olfactifs.

Des injections unilatérales de PicROTOXINE (ou préférentiellement de siARN) induisant un blocage spécifique de chaque hémisphère dans le cadre d'un apprentissage complexe comme l'inversion de consigne ou le *feature* négatif permettraient de déterminer si le facteur de latéralisation est effectivement conservé. Cette latéralisation pourrait constituer une propriété davantage essentielle lorsqu'il s'agit de tâches cognitives élaborées, dont le degré d'implication pourrait être corrélé ou proportionnel au niveau de complexité de la tâche associative. Dans ce contexte, Komischke et coll. [22] ont étudié les capacités de résolution de *patterning* négatif ($A^+ B^+ AB^-$) et positif ($A^- B^- AB^+$) en dissociant la stimulation odorante de façon uni ou bilatérale aux antennes des abeilles.

Ils ont ainsi démontré que, contrairement à l'envoi simultané et bilatéral des odeurs qui générerait des résolutions effectives dans les deux cas, la réception unilatérale de stimulus ne permettait de résoudre que le protocole en version positive, et non en version négative [22]. Les auteurs attribuent cette différence au fait que l'afférence bilatérale de l'information olfactive constitue un élément indispensable au traitement non élémentaire de la tâche de *patterning* négatif, tandis que la résolution du *patterning* positif, admettant une résolution par des processus élémentaires simples, ne requiert pas cette bilatéralité du signal. Dans notre cas, ce type d'approche pourrait se révéler très intéressant puisque les protocoles employés sont distincts et admettent également une résolution par des stratégies à la fois impliquant des voies élémentaires et non élémentaires.

La spécialisation des calices, notamment en terme de position latérale ou médiane de ces structures, pourrait également constituer un élément d'étude intéressant. L'injection de PicROTOXINE très localisée dans le calice médian ou dans le calice latéral permettrait ainsi de déterminer si la sous-localisation anatomique des afférences GABAergiques dans ces aires se révèle être biaisée, et si cette asymétrie joue un rôle dans la résolution du problème cognitif, même si *a priori*, il ne paraît pas évident qu'il existerait une spécialisation de certaines zones des calices dans ce mécanisme.

6.4 Comment le niveau de similarité des odeurs influence la performance ?

Il a été démontré que les performances cognitives des abeilles étaient directement dépendantes du degré de similarité chimique des odeurs utilisées comme stimuli conditionnels lors d'un apprentissage olfactif, de la même façon que la résolution d'une tâche est d'autant plus aisée que les éléments à discriminer présentent des traits facilement discernables. A l'évidence, les caractéristiques moléculaires et perceptuelles des odeurs constituent les clés de la discrimination olfactive mise en jeu par le conditionnement du comportement, et il est probable que le niveau de similarité - ou de dissimilarité – des odeurs aura une influence essentielle sur la capacité de résolution, et ce *a priori* d'autant plus que la tâche sera complexe.

Dans le cadre du conditionnement de *patterning* négatif impliquant la différenciation de deux éléments seuls renforcés et d'un mélange binaire non renforcé ($A^+ B^+ AB^-$), la réduction de similarité entre les stimuli, c'est-à-dire du nombre d'éléments communs entre les odeurs seules et le mélange, augmente la capacité de discriminer ces éléments par un renforcement des degré de contraste entre les signaux [25]. Les travaux de Deisig et coll. [25] interprètent donc cette potentialisation de la discrimination grâce aux prédictions des théories de l'indice unique [122] et configurales [27], qui supposent que le traitement du mélange composite exclut la sommation linéaire des forces asso-

ciatives de ses éléments. Il apparaît néanmoins, étant donné que le niveau de similarité des composants est un facteur important, que la théorie de l'indice unique n'explique pas totalement les résultats obtenus dans ces études [25]. De ce fait, la résolution de ce type de tâches strictement non élémentaires semble reposer sur un compromis entre ces concepts, tout en rejetant la théorie configurale extrême qui postule qu'un composé est encodé comme un nouveau stimulus totalement indépendant de ses éléments [27].

Dans le cadre de ce présent travail portant sur des apprentissages ambigus - sans pour autant être purement non élémentaires - il paraît donc intéressant d'évaluer l'effet de niveaux de similarité variables entre les différents éléments odorants utilisés sur les performances, ainsi que sur l'implication des neurones récurrents que nous avons montré être indispensables aux résolutions complexes. Ainsi une tâche de *feature* négatif simplifiée par le seul fait de diminuer le niveau de similarité entre les odeurs pourrait proportionnellement s'affranchir de la nécessité de ce circuit, puisque les résultats tendent à prouver que les résolutions simples reposent sur des réseaux distincts, et notamment pourraient s'opérer au niveau des lobes antennaires [21, 46, 47]. Nous avons vu que pour les apprentissages constituant les essais contrôles de chaque problème (notamment le paradigme $A^+ BC^-$ contrôle de $A^+ AB^-$, paragraphes 4.1.3 et 4.1.1, respectivement), le blocage des neurones récurrents au niveau des calices des corps pédonculés n'avait pas d'effet sur leur résolution. Cette observation s'explique facilement puisqu'*a priori* ces neurones sont spécifiquement dédiés

aux apprentissages relevant d'associations ambiguës. L'idée de ces expériences serait donc de déterminer le niveau seuil d'ambiguïté, c'est-à-dire du nombre critique d'éléments communs entre les stimuli odorants, au-delà duquel le circuit récurrent devient indispensable. De la même façon, de précédentes études ont démontré que le blocage de la transmission GABAergique au niveau des lobes antennaires, première aire d'afférence et de stockage des informations olfactives, entraînait un défaut de discrimination d'odeurs similaires mais pas d'odeurs clairement dissimilaires [86]. L'intégrité des récepteurs ionotropiques au GABA est également essentielle au traitement du mélange odorant en tant que stimulus configural et à la formation du percept olfactif unique pour des odeurs composites [84]. Ces résultats indiquent que la neurotransmission inhibitrice au GABA assurée par les inter-neurones du lobe antennaire régulent de façon prépondérante la spécificité de la mémoire associative olfactive dans ces structures, notamment dans le cadre d'opérations olfactives configurales. Il semble donc intéressant d'évaluer si un mécanisme similaire s'opère à plus haut niveau dans les corps pédonculés par une approche expérimentale comparable.

6.5 Comment accéder à l'activité des neurones ?

L'implication des neurones récurrents des corps pédonculés lors des apprentissages ambigus a été mise en évidence par des approches invasives pharmacologiques. L'une des pistes expérimentales envisageables consisterait alors à accéder de manière plus précise et plus spécifique au rôle fonctionnel de ces

neurones, en établissant le lien direct entre l'altération de l'activité de ces neurones et l'effet comportemental, notamment par des techniques d'imagerie calcique ou d'électrophysiologie *in situ* lors d'un apprentissage complexe après injection de Picrotoxine. L'imagerie calcique combinée à des techniques pharmacologiques lors d'une stimulation olfactive a notamment permis de visualiser le profil fonctionnel des interactions inhibitrices et des connections entre interneurons au GABA dans les glomérules des lobes antennaires, et de décrire l'activité combinatoire de ces neurones en relation avec le traitement des informations olfactives [92, 171–173]. Sur des cellules de Kenyon isolées, l'utilisation de l'imagerie calcique pendant un apprentissage associatif olfactif a également permis de définir deux sous-populations fonctionnelles de neurones en fonction de leur niveau de plasticité en réponse à l'application combinée de GABA et d'acétylcholine [172, 173]. Ceci suggère que les neurones des corps pédonculés contribuent au traitement temporel des afférences excitatrices - informations de la voie olfactive - et inhibitrices - signaux issus des neurones récurrents - et que les mécanismes neuronaux de cette relation temporelle très fine entre ces afférences antagonistiques affecte l'apprentissage de façon critique [172], notamment de par un encodage sporadique et désynchronisé des cellules de Kenyon en réponse aux odeurs [80]. D'autres études suggèrent également que la modulation de l'activité des cellules de Kenyon en lien avec l'apprentissage est assurée par le niveau d'inhibition apportée par les neurones récurrents du PCT, et ont démontré par des enregistrements d'imagerie calcique et d'électrophysi-

siologie de ces neurones pendant un apprentissage, un changement d'activité des CK et de leurs neurones efférents en réponse au stimulus appris [52, 174].

La reproduction des techniques d'imagerie fonctionnelle et d'électrophysiologie sur les neurones récurrents pendant des apprentissages ambigus permettrait effectivement d'apporter la preuve de leur implication, en corrélant la perte de fonction par de l'interférence ARN ou des injections pharmacologiques aux répercussions comportementales en terme de résolution cognitive.

En revanche, même si la question - et l'intérêt - théorique de cette procédure sont évidents, le problème reste méthodologique et technique, puisqu'il paraît concrètement difficile de ne marquer avec une sonde calcique que ces neurones récurrents, qui constituent une petite population d'une cinquantaine de neurones très localisés [43, 63]. Dans ce contexte, l'utilisation d'outils viraux pour adresser des gènes aux neurones est une technique assez répandue. Cette technique permet de transférer notamment des marqueurs fluorescents ou des sondes calciques dans des neurones de façon plus ou moins spécifique, en fonction du promoteur employé permettant de restreindre l'expression du transgène dans les neurones cibles et selon les caractéristiques considérées lors du choix du virus (taille de l'insert, neurones cibles, persistance de l'expression). Ce type d'approche, qui se révélerait très spécifique à ces neurones récurrents d'intérêt, pourrait ainsi constituer un argument fort quant à la conservation dans le règne animal d'une règle biologique de spécialisation de populations neuronales pour différents niveaux de complexité cognitive.

Chapitre 7

Conclusion

It's more fun to experience things when you don't know what's going to happen.

– Louis C.K.

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'implication de l'inhibition exercée par les neurones récurrents du tractus protocérébro-calical (PCT) dans les mécanismes neurobiologiques qui sous-tendent la résolution par la voie non élémentaire des formes ambiguës d'apprentissage olfactif chez l'abeille. Ces résultats ont été obtenus par la combinaison d'approches invasives pharmacologiques et d'études comportementales, et apportent de nouvelles connaissances quant aux réseaux neuronaux requis lors des apprentissages associatifs complexes chez l'insecte. Ils démontrent l'implication de cette boucle de rétrocontrôle au cours des processus d'acquisition appétitive ou aversive et de rappel, grâce à une signalisation inhibitrice de type GABAergique nécessitant de façon

spécifique les récepteurs-canaux ionotropiques présents à la surface des calices des corps pédonculés. La perte de la capacité d'apprentissage d'une tâche d'inversion de consigne ou de *feature* négatif par le blocage de ces récepteurs est interprétée comme une altération globale des mécanismes cognitifs non élémentaires de résolution du problème rencontré. Ceci est indépendant des processus d'extinction de mémoire acquise, ainsi que de perturbations des processus de rappel ou de perception des odeurs.

Ces observations sont cohérentes aux résultats obtenus chez les vertébrés, et suggèrent l'existence de structures cérébrales fonctionnellement spécifiques et dédiées à la résolution de tâches cognitives d'ordre supérieur conservées au sein des différentes espèces animales. Néanmoins le rôle fonctionnel de cette signalisation GABAergique récurrente dans le cerveau de l'abeille doit être précisé, afin d'explorer plus avant les mécanismes en jeu lors d'un apprentissage ambigu.

L'approche combinée du comportement et des techniques d'imagerie *in vivo* ou d'électrophysiologie devrait par exemple permettre de préciser la dynamique d'activité et les caractéristiques de ces neurones, dont le rôle reste jusqu'alors encore incompris.

Chapitre 8

Publications

Some people live more in 20 years than others do in 80. It's not the time that matters, it's the person.

– The Doctor, *The Lazarus Experiment* - *Doctor Who*.

GABAergic feedback signaling into the calyces of the mushroom bodies enables olfactory reversal learning in honey bees

Constance Boitard^{1,2}, Jean-Marc Devaud^{1,2}, Guillaume Isabel^{1,2}, Martin Giurfa^{1,2}.

Publié le 29 juillet 2015 à *Frontiers in Behavioral Neuroscience*.

1 - Université de Toulouse, UPS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France.

2 - CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

GABAergic feedback signaling into the calyces of the mushroom bodies enables olfactory reversal learning in honey bees

Constance Boitard^{1,2}, Jean-Marc Devaud^{1,2}, Guillaume Isabel^{1,2†} and Martin Giurfa^{1,2*†}

¹ Research Center on Animal Cognition (UMR 5169), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Toulouse, France,

² Research Center on Animal Cognition (UMR 5169), Université Paul Sabatier, Toulouse, France

In reversal learning, subjects first learn to respond to a reinforced stimulus A and not to a non-reinforced stimulus B (A⁺ vs. B⁻) and then have to learn the opposite when stimulus contingencies are reversed (A⁻ vs. B⁺). This change in stimulus valence generates a transitory ambiguity at the level of stimulus outcome that needs to be overcome to solve the second discrimination. Honey bees (*Apis mellifera*) efficiently master reversal learning in the olfactory domain. The mushroom bodies (MBs), higher-order structures of the insect brain, are required to solve this task. Here we aimed at uncovering the neural circuits facilitating reversal learning in honey bees. We trained bees using the olfactory conditioning of the proboscis extension reflex (PER) coupled with localized pharmacological inhibition of Gamma-AminoButyric Acid (GABA)ergic signaling in the MBs. We show that inhibition of ionotropic but not metabotropic GABAergic signaling into the MB calyces impairs reversal learning, but leaves intact the capacity to perform two consecutive elemental olfactory discriminations with ambiguity of stimulus valence. On the contrary, inhibition of ionotropic GABAergic signaling into the MB lobes had no effect on reversal learning. Our results are thus consistent with a specific requirement of the feedback neurons (FNs) providing ionotropic GABAergic signaling from the MB lobes to the calyces for counteracting ambiguity of stimulus valence in reversal learning.

Keywords: reversal learning, honey bees, mushroom bodies, GABAergic signaling

Introduction

Associative learning may be divided in two main categories: (i) elemental learning, in which linear and unambiguous links are established between events (Rescorla and Wagner, 1972); and (ii) non-elemental learning, in which the links established between events are ambiguous and non-linear (Rudy and Sutherland, 1989; Sutherland and Rudy, 1989). In Pavlovian learning, for instance, two levels of stimulus ambiguity are represented by differential and reversal conditioning. In differential conditioning, two conditioned stimuli (CS) A and B are unambiguously associated

Abbreviations: AL, Antennal Lobe; APL, Anterior Paired Lateral neurons; CS, Conditional Stimulus; FN, Feedback Neurons; GABA, Gamma-AminoButyric Acid; KC, Kenyon Cells; LH, Lateral Horn; MBs, Mushroom Bodies; PBS, Phosphate Buffer Saline; PCT, Protocerebro-Calycal Tract; PER, Proboscis Extension Reflex; PNs, Projection Neurons; PTX, Picrotoxin; US, Unconditional Stimulus.

OPEN ACCESS

Edited by:

Carmen Sandi,
École Polytechnique Fédérale de
Lausanne, Switzerland

Reviewed by:

Ayşe Yaralı,
Leibniz Institute for Neurobiology,
Germany
Uli Mueller,
Saarland University, Germany

*Correspondence:

Martin Giurfa,
Research Center on Animal Cognition
(UMR 5169), Centre National de la
Recherche Scientifique (CNRS),
118 route de Narbonne,
31062 Toulouse cedex 09, France
martin.giurfa@univ-tlse3.fr

[†] These authors shared senior
authorship.

Received: 31 May 2015

Accepted: 13 July 2015

Published: 29 July 2015

Citation:

Boitard C, Devaud J-M, Isabel G and
Giurfa M (2015) GABAergic feedback
signaling into the calyces of the
mushroom bodies enables olfactory
reversal learning in honey bees.
Front. Behav. Neurosci. 9:198.
doi: 10.3389/fnbeh.2015.00198

with an unconditioned stimulus (US) and with the absence of US, respectively (A^+ vs. B^-). In reversal conditioning, a first differential conditioning phase (A^+ vs. B^-) is followed by a second phase, in which stimulus contingencies are reversed (A^- vs. B^+). Thus, the addition of the second phase generates a transient ambiguity of stimulus outcome ($A^+ \rightarrow A^-$ and $B^- \rightarrow B^+$) that needs to be overcome.

In mammals, different brain structures are associated with learning forms exhibiting different levels of ambiguity. While the hippocampus seems to be dispensable for non-ambiguous, elemental discriminations (Rudy and Sutherland, 1989; Sutherland and Rudy, 1989; Stupien et al., 2003) it is required—together with the cortical system—for learning of non-linear, ambiguous discriminations (Rudy and Sutherland, 1989; Sutherland and Rudy, 1989; Dusek and Eichenbaum, 1997; Rudy and O'Reilly, 1999, 2001; Rudy et al., 2002; Stupien et al., 2003). In insects, comparable results were found in the honey bee, an insect which has a model status for studies on learning and memory (Menzel, 1999; Giurfa, 2003, 2007; Giurfa and Sandoz, 2012), and which learns efficiently olfactory reversal discriminations (Ben-Shahar et al., 2000; Komischke et al., 2002; Hadar and Menzel, 2010; Mota and Giurfa, 2010). Pharmacological blocking of the mushroom bodies (MBs), higher-order brain structures associated with memory storage and retrieval (Menzel, 1999, 2014; Giurfa and Sandoz, 2012) impairs reversal learning but leaves intact the capacity to achieve two successive elemental olfactory discriminations (Devaud et al., 2007).

Here, we aimed at uncovering the mechanisms underlying the necessity of MBs for reversal learning. We focused on the Gamma-AminoButyric Acid (GABA)ergic signals provided by A3v and A3d neurons, which provide the only inhibitory feedback circuits known so far in the MBs of the honey bee (Bicker et al., 1985; Gronenberg, 1987; Grünwald, 1999a,b). Both innervate the output region of the MBs (the lobes); A3v neurons feedback onto the input region (the calyces) of the MBs and A3d neurons feedback onto the lobes themselves. We reasoned that these circuits might be crucial to inhibit responses to previously reinforced odors during the reversal phase. We thus blocked GABAergic signaling in the MBs during olfactory reversal learning by locally injecting antagonists of ionotropic or metabotropic GABA receptors, into the calyces or the lobes. In this way, we aimed at determining the GABA receptors relevant for this task. We show that only ionotropic GABAergic signaling in the calyces is required for reversal learning but not for two consecutive elemental discriminations. We thus provide a circuit-based explanation of the implication of MBs in reversal learning and discuss the specialization of distinct brain areas in learning forms of variable complexity.

Materials and Methods

Animal Preparation

Female honey bee foragers (*Apis mellifera*) were captured at the entrance of the hive in the morning of each experimental day. To be handled properly, they were anaesthetized on ice

for a few minutes until complete immobilization. They were then harnessed individually in small metal tubes. Only the antennae and the mouthparts remained free to move (Bitterman et al., 1983). This preparation ensures optimal conditions for the olfactory conditioning of the proboscis extension reflex (PER; Bitterman et al., 1983; Matsumoto et al., 2012) which was used in our experiments. In this protocol, harnessed bees, which extend the proboscis upon antennal stimulation with sucrose solution (unconditioned stimulus or US), learn to associate a neutral odorant (conditioned stimulus or CS) with the sucrose delivered to the antennae and the proboscis, and respond afterwards with a PER to the conditioned odorant (Bitterman et al., 1983; Giurfa and Sandoz, 2012; Matsumoto et al., 2012). As PER conditioning was combined with localized microinjections of GABAergic antagonists in the bee brain, a piece of cuticle was removed from the head to expose the brain and allow later injections. The brain was then accessible through a window located between the compound eyes, the antennae and the median ocellus. The piece of cuticle was then put back in its original position to avoid brain desiccation. Bees were fed with 5 μ L of sucrose solution (50% weight/weight) before being stored in a dark humid chamber at room temperature for 3 h in order to allow recovery until the experiment.

Injections

Picrotoxin (PTX 5 μ M, Sigma-Aldrich France) and CGP₅₄₆₂₆ (250 μ M, RnD Systems France) were used to block ionotropic GABA (Froese et al., 2014) and metabotropic GABA (Dupuis et al., 2010) receptors, respectively. We used the procedure established by Devaud et al. (2007) for microinjections in the MBs of the honey bee. Briefly, drugs were dissolved in a phosphate buffer saline solution (PBS) which was also used as a control. The PBS (in mM) solution consisted of: sucrose, 160; glucose, 25; HEPES, 10; MgCl₂, 4; NaCl, 130; KCl, 6; CaCl₂, 5 (pH 6.7). Methylene blue (1 mM, Sigma-Aldrich France) was added to the solutions to visualize and control the success and correct location of injections. The volume of the injected solution was first calibrated by injecting the solution into a drop of mineral oil using a Malassez cell. Depending on the experiment, a volume of 0.5 nL of either PTX, CGP₅₄₆₂₆ or PBS was injected bilaterally, between the lateral and median calyces, or in the vertical lobes of the MBs using a pulled glass capillary (GC 100–10, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) connected to a pressure microinjector (FemtoJet express, Eppendorf, France). The injection was performed 45 min after the first phase and 15 min before the second phase.

Preliminary Experiments

As MB blockade by procaine impairs reversal but not differential conditioning (Devaud et al., 2007), we reasoned that a similar effect could be obtained after PTX and/or CGP₅₄₆₂₆ injection if the GABAergic signaling targeted by these drugs underlies the procaine effect. Pilot experiments (Figure 1) were therefore designed to define the concentrations of PTX and CGP₅₄₆₂₆ necessary to target efficiently ionotropic and metabotropic GABA receptors, respectively, while leaving intact the capacity

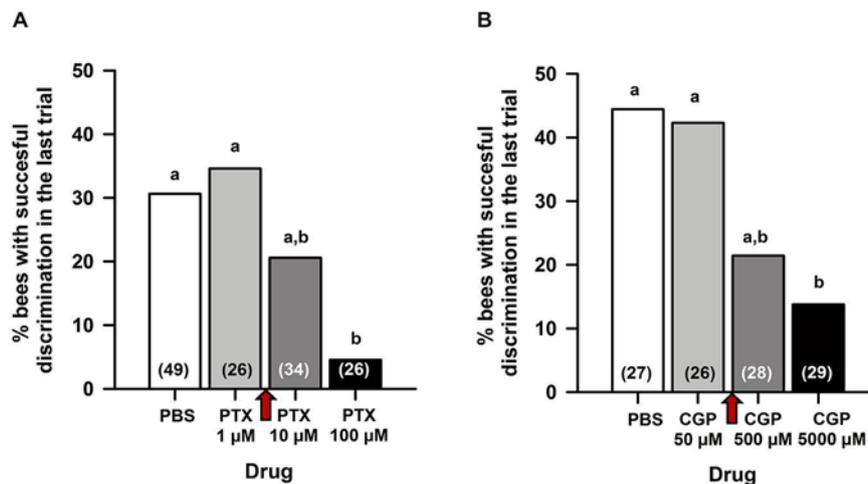


FIGURE 1 | Preliminary experiments for choosing the concentration of picrotoxin (PTX) and CGP₅₄₆₂₆ to be used in the reversal learning experiments. Fifteen minutes before conditioning, bees were injected in the MB calyces with either PBS or one of the two antagonists, and subject to a classical differential conditioning with a rewarded odor A and an unrewarded odor B (A⁺ vs. B⁻). Sample sizes are indicated in parentheses within bars. **(A)** In the case of PTX, three concentrations were assayed: 1, 10 and 100 μM. The percentage of bees exhibiting successful discrimination (i.e. responding to odor A and not to odor B in the last conditioning trial) varied with the concentration of PTX tested. Different capital letters above bars indicate significant differences. PBS-injected bees and bees injected with PTX 1 μM learned the discrimination and reached comparable levels of discrimination (test for comparison of multiple proportions; NS). Bees injected with PTX 100 μM did not learn the discrimination and differed significantly from PBS-injected bees

and from bees injected with PTX 10 μM. The concentration of PTX 10 μM yielded intermediate results. A concentration of PTX 5 μM (red arrow between 1 and 10 μM) was thus chosen for our experiments. **(B)** In the case of CGP₅₄₆₂₆, three concentrations were assayed: 50, 500 and 5000 μM. The % of bees exhibiting successful discrimination (i.e. responding to odor A and not to odor B in the last conditioning trial) varied with the concentration of CGP₅₄₆₂₆ tested. Different capital letters above bars indicate significant differences. PBS-injected bees and bees injected with CGP₅₄₆₂₆ 50 μM learned the discrimination and reached comparable levels of discrimination (test for comparison of multiple proportions; NS). Bees injected with CGP₅₄₆₂₆ 5000 μM showed deficient discrimination learning and differed significantly from PBS-injected bees. The concentration of CGP₅₄₆₂₆ 500 μM yielded intermediate results. Thus, a concentration of 250 μM CGP₅₄₆₂₆ (red arrow between 50 and 500 μM) was chosen for our experiments.

to learn a simple olfactory discrimination. Three hours after opening a window in the head capsule (see above) and 15 min before conditioning, bees were injected in the MB calyces with either PBS or one of the two antagonists, and subject to a classical differential conditioning with a rewarded odor A and an unrewarded odor B (A⁺ vs. B⁻). In the case of PTX (**Figure 1A**), which blocks ionotropic GABA receptors, three concentrations were assayed, each in an independent group of bees: 1 μM, 10 μM or 100 μM. The higher PTX concentration was chosen as it was shown to abolish inhibitory GABAergic signaling when injected into the antennal lobes (ALs) of honey bees (Stopfer et al., 1997), locusts (MacLeod and Laurent, 1996), moths (Mwilaria et al., 2008) and fruit flies (Wilson and Laurent, 2005) before a differential conditioning. In all cases, control bees injected with PBS learned the olfactory discrimination. PTX-injected bees also learned the discrimination at a concentration of 1 μM but not at 100 μM. The concentration of 10 μM yielded intermediate results. We thus chose the concentration of 5 μM PTX (between 1 and 10 μM) for our experiments. In the case of CGP₅₄₆₂₆ (**Figure 1B**), which blocks metabotropic GABA receptors, three concentrations were assayed, each in an independent group of bees: 50, 500 or 5000 μM. The concentration of CGP₅₄₆₂₆ 500 μM is known to affect the response of bathed Kenyon cells (KCs) *in vivo* upon odorant delivery (Froese et al., 2014). In all cases, control bees injected with PBS learned

the olfactory discrimination. CGP₅₄₆₂₆-injected bees learned the discrimination at a concentration of 50 μM but not at 5000 μM; bees injected with the concentration of 500 μM had an intermediate discrimination. Thus, a concentration of 250 μM CGP₅₄₆₂₆ (between 50 and 500 μM) was chosen for our experiments.

Experiments

Three types of experiments were performed (**Figure 2**): (1) *reversal learning* (A⁺ vs. B⁻ → A⁻ vs. B⁺); (2) *consecutive differential learning* (A⁺ vs. B⁻ → C⁺ vs. D⁻); and (3) *extinction* (A⁺ vs. B⁻ → A⁻ and B⁻). In all three experiments, each conditioning phase consisted of five rewarded and five non-rewarded trials presented in a pseudorandomized sequence (10 trials in total), except in the extinction protocol where all trials were unrewarded (five with each odorant) in the second phase. The intertrial interval (ITI) was 8 min. In all three cases, only bees that learned the first discrimination (i.e., that responded more to the rewarded than to the non-rewarded odorant) were used (Roussel et al., 2010; Pamir et al., 2011), as studying reversal learning is only meaningful in the case of first-phase effective learners (Mota and Giurfa, 2010; de Brito Sanchez et al., 2015). The first phase of all three experiments was identical and consisted of an olfactory differential conditioning with two odors, limonene ([R]-(+)-limonene 97%, Sigma-Aldrich France) and eugenol (eugenol ≥ 99%, Sigma-Aldrich

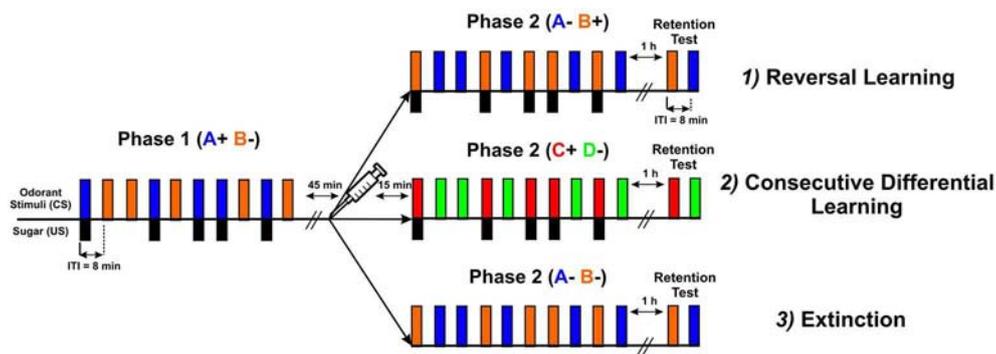


FIGURE 2 | Scheme describing the three types of experiments performed: (1) reversal learning (A^+ vs. $B^- \rightarrow A^-$ vs. B^+); (2) consecutive differential learning (A^+ vs. $B^- \rightarrow C^+$ vs. D^-); and (3) extinction (A^+ vs. $B^- \rightarrow A^-$ and B^-). All three types had the same common first phase, in which bees were trained to discriminate two odorants (CS), one (blue bars) paired five times with sucrose delivery (black bars, US) and the other presented five times without sucrose (orange bars). The intertrial interval (ITI) was 8 min. After the first phase, bees experienced a 45 min rest followed by an injection of PBS, PTX or

CGP₅₄₆₂₆. The second conditioning phase started 15 min after injection. In the reversal learning experiment, the same odorants were presented with a reversed contingency. In the consecutive differential-learning experiment, odorants A and B were replaced by two novel odorants C and D. In the extinction experiment, odorants A and B were presented again but without sucrose reward. In all three protocols, a retention test was performed 1 h after the end of the second phase. In this test, the two odorants used in the last conditioning phase were presented without sucrose reinforcement.

France), one rewarded with a 50% (weight/weight) sucrose solution (A^+) and the other non-rewarded (B^-). Odorants were chosen to reproduce the conditions of Devaud et al. (2007) and their roles as A or B were balanced. After the first phase, bees experienced a 45 min rest followed by an injection of PBS, PTX or CGP₅₄₆₂₆. The second conditioning phase started 15 min after injection. In the reversal learning experiment, the same odors were presented with a reversed contingency, as odor A was no longer rewarded while odor B was rewarded (phase 2: A^- vs. B^+) thus creating a transient ambiguity of stimulus valence. In the experiment using two consecutive differential learning phases, A and B were replaced by two novel odors C (1-heptanal $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich France) and D (1-nonanol $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich France) in the second phase (phase 2: C^+ vs. D^-). In the extinction experiment, odors A and B were also presented in the second phase but without reward (phase 2: A^- and B^-). In all three protocols, a retention test was performed 1 h after the end of the second phase. In this test, the two odorants used in the last conditioning phase were presented without sucrose reinforcement. The inter-test interval was also 8 min. The sequence of odorant presentations was randomized from bee to bee.

Conditioning Procedure

We followed the standard procedures described in Matsumoto et al. (2012). In all experiments, only bees responding with a PER to the sucrose stimulus before conditioning and after the retention test were used. Each conditioning trial lasted 40 s, starting when the bee was positioned in front of the odor-delivery system sending a clean air flow at 90–100 mL/min. Fifteen seconds after the start of the trial, the odorant was delivered by a computer-controlled olfactometer during 4 s by diverting the air flow through a syringe containing a filter paper soaked with 4 μ L of pure odorant. To induce a PER in the case of the rewarded

odor presentations, both antennae were simultaneously touched with a toothpick soaked with 50% sucrose solution during 3 s, starting 3 s after the odor onset. Therefore, the inter-stimulus interval was 3 s and the stimulus overlap was 1 s.

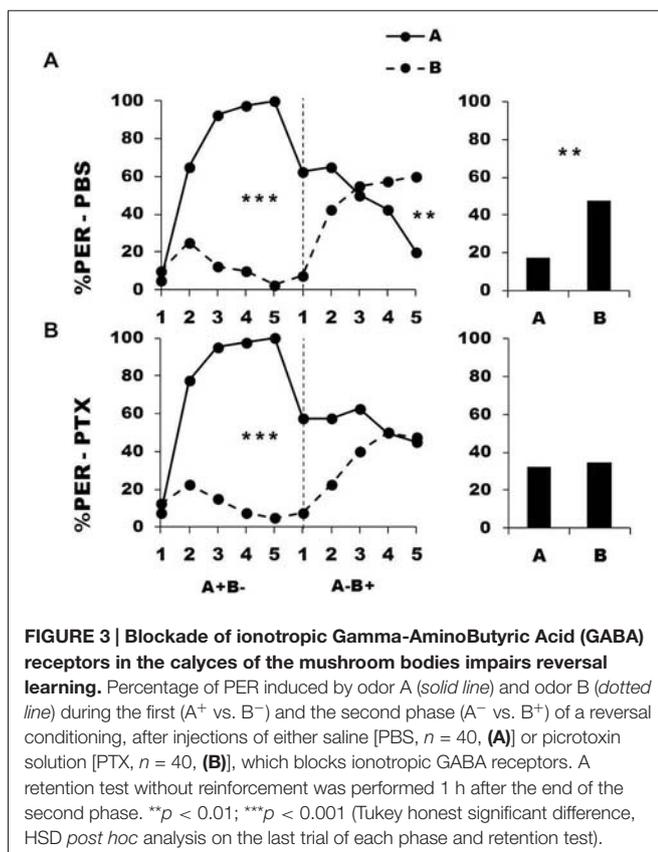
Statistical Analysis

All results are presented as percentages of bees exhibiting a PER to the conditioned odorants. The data met the conditions required to apply an ANOVA to a dichotomous dependent variable (Lunney, 1970; D'Agostino, 1971) and thus allowed the use of repeated-measurement ANOVA for comparisons between and within groups. A Tukey honest significant difference (HSD) *post hoc* analysis was performed after ANOVA to specify statistical differences. The statistics reported for the first phase of each experiment refer to the selected group of bees which learned the discrimination and which entered the second phase. All statistical analyses were performed using Statistica 7.1 (StatSoft France).

Results

Experiment 1: Blocking Ionotropic, but not Metabotropic, GABAergic Signaling into the MB Calyces Impairs Reversal Learning

Bees were trained during a first conditioning phase to discriminate a rewarded odorant A from a non-rewarded odorant B (A^+ vs. B^-). Afterwards, they were injected with either PBS (control group) or PTX, which blocks ionotropic GABA receptors, and subjected to a second conditioning phase in which odorant contingencies were reversed (A^- vs. B^+). **Figure 3** shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination of the first phase (85% of trained individuals). In the first conditioning phase, and prior to injection, both the PBS ($n = 40$; **Figure 3**, upper panel) and the PTX group ($n = 40$, **Figure 3**, lower panel) learned the discrimination between



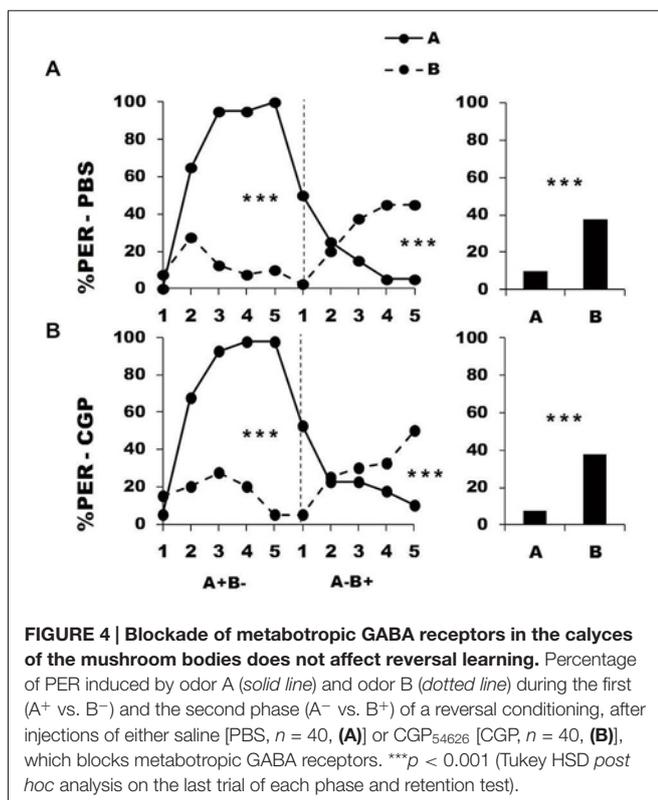
A⁺ and B⁻ (PBS, factor odorant: $F_{1,39} = 229.41$, $p = 0.0001$; PTX, factor odorant: $F_{1,39} = 248.26$, $p = 0.0001$; repeated-measure ANOVA). In both groups, differentiation between A⁺ and B⁻ occurred from the second trial onwards (Tukey HSD *post hoc* analysis: $p = 0.0001$). The interaction trial \times odorant was also significant (PBS: $F_{4,39} = 49.73$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 49.34$, $p = 0.0001$) thus showing that responses to A⁺ and B⁻ followed different trends in both groups. Importantly, a comparison between the PBS and the PTX groups at this stage showed no significant difference in their acquisition performances (factor group: $F_{2,77} = 0.69$, $p = 0.51$) thus confirming that the learning of the first-phase discrimination was identical between groups prior to drug injection.

After injection, PBS-injected bees successfully learned the discrimination of the second phase (trial \times odorant interaction: $F_{4,39} = 29.26$, $p = 0.0001$) and thus achieved the reversal learning by responding more to B⁺ than to A⁻ in the last trial (Tukey HSD for the last trial: $p = 0.006$). One hour after the end of the second conditioning phase, PBS-injected bees retained the last information learned and responded significantly more to B than to A (Figure 3, upper bar diagram: $F_{1,39} = 9.85$, $p = 0.003$). On the contrary, PTX-injected bees exhibited impaired reversal learning (trial \times odorant interaction: $F_{4,39} = 9.33$, $p = 0.0001$) as they did not respond differently to both odorants in the last trial (Tukey HSD: $p = 0.99$). In the retention test performed 1 h after the end of the second phase, these bees were still unable to differentiate between odorants A and B (Figure 3, lower bar diagram: $F_{1,39} = 0.11$, $p = 0.74$), consistently

with their incapacity to fully reverse odorant contingencies. Thus, inhibition of ionotropic GABA receptors at the level of the calyces *via* PTX impaired the capacity to achieve olfactory reversal learning in honey bees.

An important question in the case of the PTX-injected bees is whether olfactory reversal was indeed impaired by PTX or was simply delayed as could suggest the apparent decrease of responses to odorant A in the second conditioning phase. Contrarily to PBS-injected bees, the responses to A of the PTX group did not decrease during this phase (PBS group: $F_{4,39} = 12.90$, $p < 0.001$; PTX group: $F_{4,39} = 2.02$, $p = 0.55$). This shows that the decrease of responses to A was only apparent and different from that observed in the PBS-injected bees. The responses of PTX-injected bees in the retention test confirmed this conclusion: this test reflects the cumulative experience with A and B gathered up to trial 5th and allows further measuring of conditioned responses to A and B. Moreover, the time elapsed (1 h) between the end of the second phase and the retention test should favor further consolidation and reversal. However, the test performance of the PTX group did not show any sign of successful reversal. Response levels of the PTX group in the last trial of the second conditioning phase and in the retention test remained identical both for odorant A (PTX: $F_{1,39} = 1.69$, $p = 0.20$) and B (PTX: $F_{1,39} = 1.97$, $p = 0.17$). It is thus possible to conclude that the performance of the PTX-injected bees was not consistent with a delayed reversal but reflected a real impairment of the reversal process.

In a further experiment, we blocked metabotropic GABA receptors in the calyces *via* CGP₅₄₆₂₆ injection performed between the two conditioning phases. Figure 4 shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination of the first phase (87% of trained individuals). In the first conditioning phase, and prior to injection, both the PBS group ($n = 40$; Figure 4, upper panel) and the CGP₅₄₆₂₆ group ($n = 40$; Figure 4, lower panel) learned the discrimination between A⁺ and B⁻ (PBS: factor odorant: $F_{1,39} = 222.37$, $p = 0.0001$; CGP₅₄₆₂₆: $F_{1,39} = 141.31$, $p = 0.0001$). In both groups, differentiation between A⁺ and B⁻ occurred from the second trial onwards (Tukey HSD: $p = 0.0001$) and the interaction trial \times odorant was significant (PBS group: $F_{4,39} = 49.73$, $p = 0.0001$; CGP₅₄₆₂₆: $F_{4,39} = 36.66$, $p = 0.0001$). Again, the two groups showed no difference in acquisition during this first phase (factor group: $F_{2,77} = 0.61$, $p = 0.55$) thus confirming that their performances were identical prior to drug injection. After injection, both PBS and CGP₅₄₆₂₆-injected bees successfully learned the discrimination of the second phase (trial \times odorant interaction, PBS: $F_{4,39} = 30.85$, $p = 0.0001$; CGP₅₄₆₂₆: $F_{4,39} = 21.21$, $p = 0.0001$) and responded significantly more to B⁺ than to A⁻ in the last trial (Tukey HSD; PBS: $p = 0.0004$; CGP₅₄₆₂₆: $p = 0.0009$). One hour after the end of the second conditioning phase, both groups of bees retained the last information learned and responded significantly more to the odorant B than to A (PBS: $F_{1,39} = 14.79$, $p = 0.0004$; CGP₅₄₆₂₆: $F_{1,39} = 16.71$, $p = 0.0002$). Furthermore, the curves of responses to A and B in the second conditioning phase did not differ between the PBS group and the CGP₅₄₆₂₆ group (odorant A: $F_{1,39} = 0.57$, $p = 0.45$; odorant



B: $F_{1,39} = 0.04$, $p = 0.84$). Thus, inhibition of metabotropic GABA receptors at the level of the calyces *via* CGP₅₄₆₂₆ did not affect the capacity to achieve olfactory reversal learning in honey bees.

Overall, these results suggest that successful olfactory reversal learning in honey bees requires GABAergic signaling through ionotropic but not metabotropic GABA receptors located in the calyces of the MBs.

Experiment 2: Blocking Ionotropic GABAergic Signaling into the MB Calyces does not Impair the Acquisition of Two Consecutive Differential Discriminations

We next determined if the impairment of reversal learning induced by PTX was specific to this task, and thus to the ambiguity of stimulus valence created by the reversal of stimulus contingencies in the second conditioning phase, or could also occur in the case of two consecutive elemental discriminations with no ambiguity of stimulus valence. To this end, bees were trained during a first conditioning phase to discriminate a rewarded odorant A from a non-rewarded odorant B (A⁺ vs. B⁻), afterwards they were injected into the MB calyces with either PBS or PTX, and then they were subjected to a second conditioning phase with two different odorants C and D, one rewarded and the other non-rewarded (C⁺ vs. D⁻). Finally, the retention test was performed as previously. CGP₅₄₆₂₆ was not used in this experiment given its failure to block reversal learning (see “Experiment 1: Blocking ionotropic, but not metabotropic,

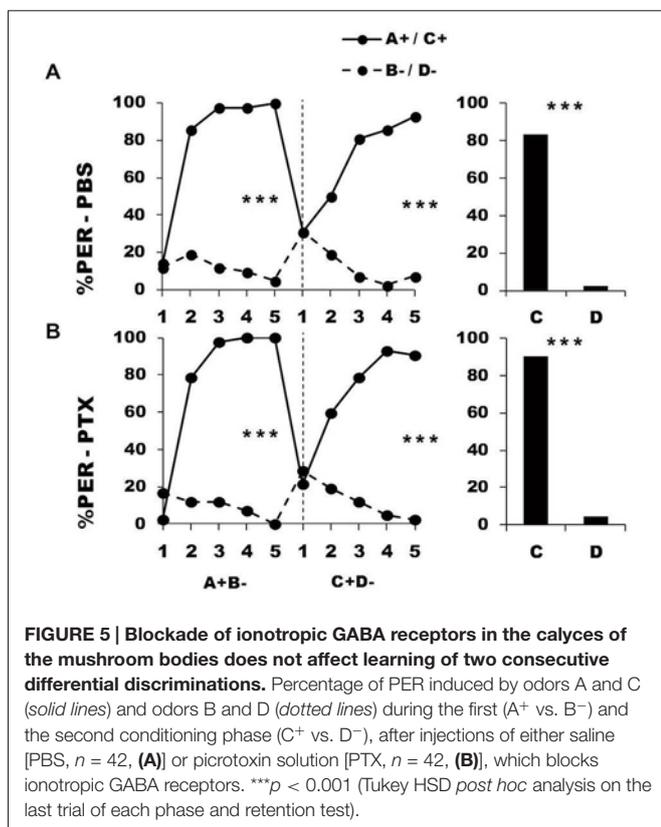
GABAergic signaling into the MB calyces impairs reversal learning” Section).

Figure 5 shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination of the first phase (87% of trained individuals). In the first conditioning phase, and prior to injection, both the PBS (*n* = 42; Figure 5, upper panel) and the PTX group (*n* = 42; Figure 5, lower panel) learned to discriminate A⁺ from B⁻ (repeated-measure ANOVA, factor odorant, PBS: $F_{1,41} = 265.31$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,41} = 502.32$, $p = 0.0001$). In both groups, differentiation between A⁺ and B⁻ occurred from the second trial onwards (Tukey HSD: $p = 0.0001$) and the interaction trial \times odorant was significant (PBS: $F_{4,41} = 54.53$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,41} = 79.19$, $p = 0.0001$), thus showing that responses to A⁺ and B⁻ followed different trends in both groups. As in the previous experiment, the PBS and the PTX groups did not differ at this stage ($F_{2,81} = 1.09$, $p = 0.34$), thus confirming that the first discrimination learning was identical between groups prior to drug injection. After injection, both groups successfully learned the discrimination C⁺ D⁻ of the second phase (trial \times odorant interaction, PBS: $F_{4,41} = 33.64$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,41} = 38.43$, $p = 0.0001$) in a similar way, and responded significantly more to C⁺ than to D⁻ in the last trial (Tukey HSD: $p = 0.0001$ in both cases). One hour after the end of the second conditioning phase, both groups of bees retained the last information learned and responded significantly more to the odorant C than to D (PBS: $F_{1,41} = 174.25$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,41} = 246.00$, $p = 0.0001$). Thus, despite its significant effect on reversal learning, GABAergic inhibition by PTX injection at the level of the calyces did not affect the ability to learn two consecutive elemental discriminations with no ambiguity of stimulus valence.

Experiment 3: Impairment of Olfactory Reversal Learning Through PTX Injection into the Calyces is Neither Due to Impaired Retrieval nor to Impaired Extinction

Two possible indirect effects could explain the impairment of reversal learning in PTX-injected bees as observed in Figure 3. First, the injection of PTX could have impaired retrieval and thus resulted in a reduction of the initial level of responses to A between the end of the first phase and the first trial of the second phase. In this case, a further decrease resulting from reversal might no longer be observed along the second phase. This possibility can be discarded as the decrease in responses to the odorant A in the first trial of the second phase, as compared to the last trial of the first phase, was similar in both groups (PTX: 58% PER, PBS: 63% PER; $F_{1,39} = 0.05$, $p = 0.82$), and nevertheless allowed successful reversal in the PBS group. Thus, PTX did not impair specifically odorant retrieval. Second, the injection of PTX might have impaired extinction learning. Indeed, reversal learning requires that the response to the formerly non-rewarded stimulus B increases while the response to the previously rewarded stimulus A extinguishes.

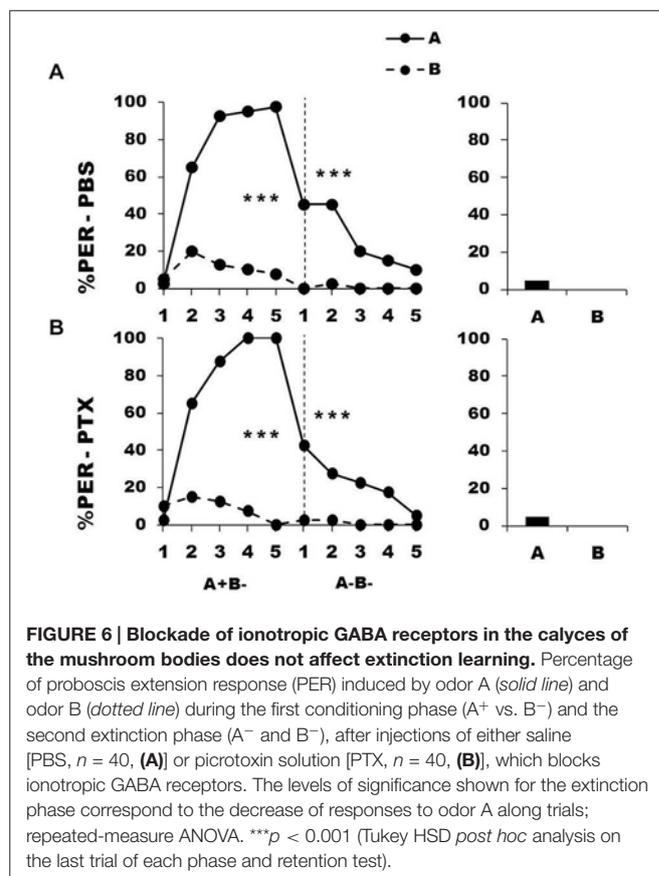
As PTX-injected bees did not diminish their responses to A when no longer rewarded, the impairment might be explained by a failure of extinction learning of A when no longer rewarded (Figure 3: 2nd phase). We thus tested whether extinction was



impaired in these animals by repeatedly presenting odorants A and B without sucrose during the second conditioning phase (A⁻ and B⁻).

Figure 6 shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination A⁺ vs. B⁻ of the first phase (89% of trained individuals). As expected, in this first phase, and prior to injection, both the PBS (*n* = 40; **Figure 6**, upper panel) and the PTX group (*n* = 40; **Figure 6**, lower panel) learned to discriminate A⁺ from B⁻ (repeated-measure ANOVA, factor odorant, PBS: $F_{1,39} = 276.83$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,39} = 418.76$, $p = 0.0001$). In both groups, differentiation between A⁺ and B⁻ occurred from the second trial onwards (Tukey HSD: $p = 0.0001$) and the interaction trial \times odorant was significant (PBS: $F_{4,39} = 38.09$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 50.68$, $p = 0.0001$). Again, the PBS and the PTX groups did not differ at this stage (factor group: $F_{2,77} = 0.39$, $p = 0.68$), thus confirming that the first discrimination learning was identical between groups prior to drug injection.

After injection, and during the second phase (extinction phase, A⁻ B⁻), both groups showed a significant decrease in their response to the non-rewarded odorant A (PBS: $F_{4,39} = 9.64$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 6.48$, $p = 0.0001$). In both cases, extinction was almost complete at the end of the second phase, as the responses in the 5th trial did not differ from 0 (*t*-test: $t_{1,39} = 1.43$, $p = 0.16$). The decrease of the responses to A was statistically equivalent in the two groups (group effect: $F_{1,39} = 0.51$, $p = 0.48$; group \times trial interaction: $F_{4,39} = 1.46$, $p = 0.21$), thus showing that extinction was preserved in the PTX-injected bees and was



comparable to that of PBS-injected bees. As expected, responses to B⁻ remained at the low level already reached at the end of the first phase and did not vary along the second phase ($F_{4,39} = 1.00$, $p = 0.41$ for both groups). Due to this, bees of both groups did not respond differently to A and B in the retention test performed 1 h after the end of conditioning ($F_{1,39} = 2.05$, $p = 0.16$ for both groups).

Taken together, these results indicate that olfactory memory retrieval (accessible through the first trial of the second phase) as well as extinction learning (accessible through the variation of responses to A in the second phase) were unaffected by PTX injection into the calyces of the MBs. Therefore, impairment of reversal learning was not due to the impossibility to learn changes in reinforcement outcome. Rather, PTX blockade seems to affect specifically the processes necessary to achieve *reversal* of stimulus valence.

Experiment 4: Blocking Ionotropic GABAergic Signaling into the MB Lobes Impairs Neither Reversal Learning nor Two Consecutive Differential Discriminations

In the honey bee brain, two GABAergic subpopulations of neurons provide inhibitory feedback to the MBs (Bicker et al., 1985; Rybak and Menzel, 1993; Grünwald, 1999a; Ganeshina and Menzel, 2001): A3v neurons arborize in the vertical lobe and project to the calyces, mainly to the basal ring and the lip (Bicker et al., 1985; Rybak and Menzel, 1993), while A3d

neurons arborize mainly in the medial lobe and project to the vertical lobe (Bicker et al., 1985). While our previous experiments targeted GABAergic signaling into the calyces, and thus most probably A3v neuron signaling, it remained to determine whether the potential GABAergic contribution of A3d neurons was equally important for reversal learning. To study the possible implication of these neurons (i.e., of GABAergic signaling into the vertical lobes) in olfactory reversal learning, we coupled reversal conditioning with an injection of either PBS or PTX into the MB vertical lobes. The injection was performed as in the previous experiments, between the two conditioning phases.

Figure 7 shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination A^+ vs. B^- of the first phase (86% of trained individuals). In this first phase, and prior to injection, both the PBS ($n = 40$; **Figure 7**, upper panel) and the PTX group ($n = 40$; **Figure 7**, lower panel) learned to discriminate A^+ from B^- (repeated-measure ANOVA, factor odorant, PBS: $F_{1,39} = 146.75$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,39} = 180.91$, $p = 0.0001$). In both groups, differentiation between A^+ and B^- occurred from the second trial onwards (Tukey HSD: $p = 0.0001$) and the interaction trial \times odorant was significant (PBS: $F_{4,39} = 38.63$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 46.49$, $p = 0.0001$), thus showing that responses to A^+ and B^- followed different trends in both groups. As in the previous experiment, the PBS and the PTX groups did not differ at this stage ($F_{2,77} = 0.82$, $p = 0.44$), thus confirming that the first discrimination learning was identical between groups prior to drug injection. After injection, both the PBS and the PTX groups successfully learned the discrimination A^- vs. B^+

of the second phase (trial \times odorant interaction, PBS: $F_{4,39} = 12.64$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 12.55$, $p = 0.0001$) and responded significantly more to B^+ than to A^- in the last trial (Tukey HSD: $p = 0.02$ in both cases). Both groups exhibited similar learning patterns during the second phase (repeated-measure ANOVA, factor group: $F_{2,77} = 0.17$, $p = 0.84$). One hour after the end of the second conditioning phase, both groups of bees retained the last information learned and responded significantly more to the odorant A than to B ($F_{1,39} = 11.32$, $p = 0.002$ for both groups).

Thus, inhibition of GABAergic signaling into the vertical lobe did not affect the ability to master reversal learning. In other words, since ionotropic GABA receptors are necessary to achieve this task in the calyces but not in the lobes, this suggests that A3d neurons are dispensable for reversal learning, contrary to A3v neurons. If this conclusion is valid, then ionotropic GABAergic feedback to the lobes *via* A3d neurons may also be dispensable for successive conditioning of two simple olfactory discriminations. To test this hypothesis, we coupled the successive conditioning of two simple discriminations ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$) with an injection of either PBS or PTX into the MB vertical lobes. The injection was performed as before, between the two conditioning phases.

Figure 8 shows the performance of bees that effectively learned the olfactory discrimination A^+ vs. B^- of the first phase (92% of trained individuals). In this first phase, and prior to injection, both the PBS ($n = 40$; **Figure 8**, upper panel) and the PTX group ($n = 40$; **Figure 8**, lower panel) learned to discriminate A^+ from B^- (repeated-measure ANOVA, factor odorant, PBS: $F_{1,39} = 227.01$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,39} = 89.49$, $p = 0.0001$). In both groups, differentiation between A^+ and B^- occurred from the second trial onwards (Tukey HSD: $p = 0.0001$) and the interaction trial \times odorant was significant (PBS: $F_{4,39} = 38.56$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{4,39} = 33.58$, $p = 0.0001$), thus showing that responses to A^+ and B^- followed different trends in both groups. As in the previous experiment, the PBS and the PTX groups did not differ at this stage (factor group: $F_{2,77} = 1.06$, $p = 0.35$), thus confirming that the first discrimination learning was identical between groups prior to drug injection.

After injection, both the PBS and the PTX groups successfully learned the discrimination $C^+ D^-$ of the second phase (trial \times odorant interaction, PBS: $F_{4,39} = 3.05$, $p = 0.002$; PTX: $F_{4,39} = 5.05$, $p = 0.0005$) and responded significantly more to C^+ than to D^- in the last trial (Tukey HSD: $p = 0.0001$ in both cases). Both groups exhibited similar learning patterns during the second phase (repeated-measure ANOVA, factor group: $F_{2,77} = 0.04$, $p = 0.96$). One hour after the end of the second conditioning phase, both groups of bees retained the last information learned and responded significantly more to the odorant C than to D (PBS: $F_{1,39} = 11.32$, $p = 0.0001$; PTX: $F_{1,39} = 13.21$, $p = 0.0001$).

The last two experiments exhibit lower response rates during the second conditioning phase when compared to the corresponding experiments in which PBS and PTX were injected into the calyces (compare **Figures 3, 7** for reversal learning, and **Figures 5, 8** for consecutive differential conditioning). This effect was common to the PBS and the PTX groups, which in all cases showed similar performances in the second conditioning phase (see **Figures 7, 8**) and could be due to a damage done to the lobes by the injection needle, leading

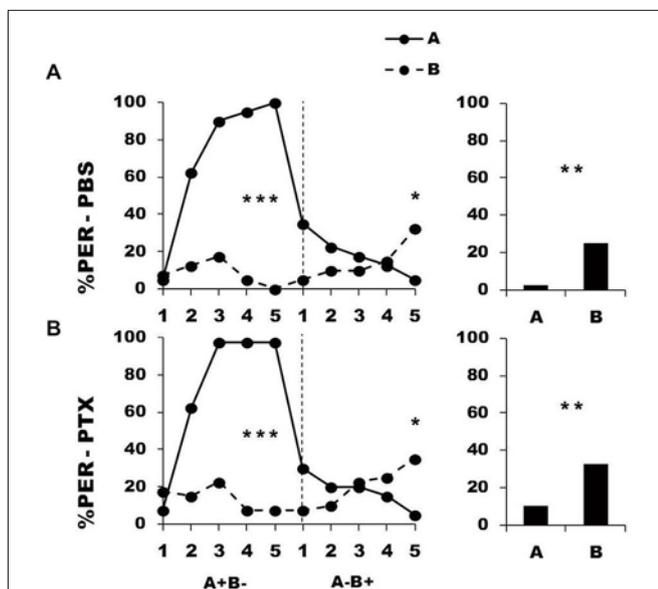
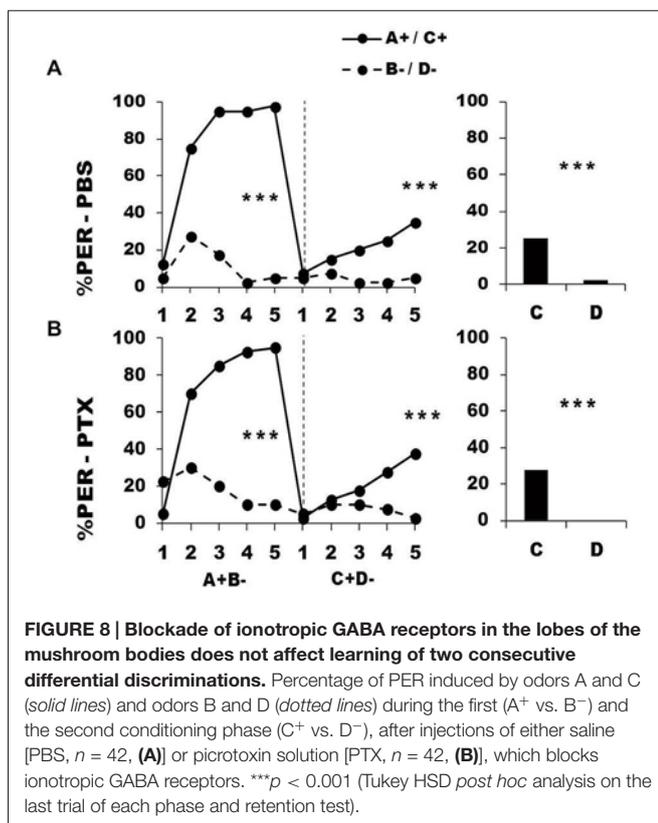


FIGURE 7 | Blockade of ionotropic GABA receptors in the lobes of the mushroom bodies does not impair reversal learning. Percentage of PER induced by odor A (solid line) and odor B (dotted line) during the first (A^+ vs. B^-) and the second phase (A^- vs. B^+) of reversal conditioning, after injection of either saline [PBS, $n = 40$, (A)] or picrotoxin solution [PTX, $n = 40$, (B)], which blocks ionotropic GABA receptors. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Tukey HSD *post hoc* analysis on the last trial of each phase and retention test).



to a possible impairment of retrieval processes localized in part in the lobes (Lozano et al., 2001) and/or of signaling from the lobes to the premotor areas (e.g., lateral horn) which control PER.

Discussion

We studied the involvement of the MBs, higher-order structures of the insect brain, in reversal learning, a form of learning that requires overcoming the temporary ambiguity of stimulus valence that underlies the transition between two conditioning phases with opposed stimulus valences. MBs were previously shown to be necessary for solving this task in honey bees as pharmacological blockade of voltage-gated Na⁺ and K⁺ currents by means of local injections of the anesthetic procaine impaired reversal learning but not the capacity to solve two consecutive simple olfactory discriminations with no ambiguity of stimulus valence (Devaud et al., 2007). Here we confirmed the necessity of MBs for reversal learning and further uncovered the mechanism and potential circuits underlying this effect. We show that inhibition of ionotropic but not metabotropic GABAergic signaling into the MB calyces impairs reversal learning, yet leaves intact the capacity to perform two consecutive elemental olfactory discriminations without ambiguity of stimulus valence. On the contrary, inhibition of ionotropic GABAergic signaling into the MB lobes had no effect on reversal learning. Our results thus suggest that A3v neurons providing ionotropic GABAergic feedback to the MB calyces, but not to the lobes themselves, seem to be specifically required

for counteracting ambiguity of stimulus valence in reversal learning.

The importance of GABAergic signaling has been demonstrated in studies of appetitive and aversive conditioning in bees (Raccuglia and Mueller, 2013) and fruit flies (Liu et al., 2007; Liu and Davis, 2009), respectively. Using simple associative conditioning protocols, it was shown that enhancement of GABAergic signaling impairs olfactory memory in these insects. In fruit flies, for instance, overexpression of the main GABA receptor gene *resistance to dieldrin* (Rdl) in the anterior paired lateral (APL) neurons, which provide GABAergic input to the MBS, impairs olfactory associative memory acquisition, but not stability. On the contrary, Rdl knockdown in the same neurons enhances memory acquisition but not memory stability (Liu et al., 2007). Rdl overexpression abolishes the normal calcium responses of the MBs to odors while Rdl knockdown increases these responses. Thus, Rdl seems to negatively modulate olfactory associative learning, possibly by gating the input of olfactory information into the MBs (Liu et al., 2007). In honey bees, delivery of the GABAergic agonist muscimol 20 min before conditioning as well as photolytic uncaging of GABA during appetitive olfactory PER conditioning impairs appetitive memory formation (Raccuglia and Mueller, 2013). Photolytic uncaging, which allows for a more precise temporal control of GABA action in the nervous system, showed that the MBs of the honey bee are GABA-sensitive during a specific time period of CS-US pairing during which GABA release impairs associative memory formation (Raccuglia and Mueller, 2013). Interestingly, upon 3-trial PER conditioning, injection of the agonist muscimol 20 min before conditioning did neither affect learning nor 2-h retention but impaired 24-h retention. In our case, the complementary strategy of injecting GABA-receptor antagonists 15 min before a multiple-trial conditioning did also preserve learning (see Figure 1) but, in the case of PTX, it impaired specifically reversal learning when injected into the calyces. Due to differences in protocols (number of trials, reversal learning in our work vs. single-phase, absolute conditioning in Raccuglia and Mueller, 2013), and in procedures, which either enhanced (Raccuglia and Mueller, 2013) or diminished GABAergic signaling (our work), a direct comparison between our results and previous works is difficult. Yet, both have in common that ionotropic GABA signaling plays an important role in olfactory learning and memory.

GABA Neurotransmission in the Mushroom Bodies of the Honey Bee

We used PTX (Sattelle et al., 1991; Buckingham et al., 2005) and CGP₅₄₆₂₆ (Blankenburg et al., 2015) to target ionotropic and metabotropic GABA receptors, respectively. Both drugs have been shown to block GABAergic neurotransmission in honey bees and affect olfactory processing (PTX: Sachse and Galizia, 2002; Barbara et al., 2005; Boumghar et al., 2012; Froese et al., 2014; CGP₅₄₆₂₆: Dupuis et al., 2010; Froese et al., 2014).

GABA is the main inhibitory neurotransmitter in insects (Hosie et al., 1997) and is largely distributed in the central nervous system (e.g., honey bee: Bicker, 1999; *Drosophila*: Enell et al., 2007; locust: Leitch and Laurent, 1996). The precise

function of GABAergic receptors and neurotransmission has been extensively studied, with GABA-immunoreactivity being mainly localized in the optic lobes (Schäfer and Bicker, 1986; Kiya and Kubo, 2010), local interneurons of the AL and extrinsic FNs innervating the MBs (Bicker et al., 1985; Ganeshina and Menzel, 2001; Okada et al., 2007). However, the specific type of GABA receptor mediating GABAergic signaling in the MBs remains unknown. Our results indicate that ionotropic GABA receptors are necessary for reversal learning, while metabotropic GABA receptors are dispensable. Moreover the fact that PTX injections into the calyces, but not into the lobes, impaired reversal learning, not only serves as a powerful control for a targeted localization of the drug applied but also allows referring this result to a specific subset of FNs. Indeed, no feed-forward (i.e., external and afferent) GABAergic signaling to the calyces has been described, and GABAergic feedback in the MBs of the honey bee brain is provided by two tracts of FNs, the A3v cluster of the protocerebro-calycal tract (PCT), which connects vertical and medial lobes with the calyces (Rybak and Menzel, 1993), and the A3d cluster, which provides local feedback from the medial and vertical lobes to the vertical lobe, probably acting on MB extrinsic neurons projecting to premotor neurons (Okada et al., 2007). Our results suggest that from these two tracts, only the A3v cluster is necessary for achieving reversal olfactory learning through ionotropic GABA receptors.

GABAergic Feedback Neurons as a Modulatory Circuit Facilitating Reversal Learning in Insects

Olfactory information is conveyed to the MBs *via* projection neurons (PNs), which contact KC, the constitutive MB neurons (Kirschner et al., 2006). Kenyon cells also receive value signals from ventral unpaired medial maxillar one neuron (VUMmx1), the neuron encoding sucrose reward in the bee brain (Hammer, 1993), so that they are subject to experience-dependent plasticity as shown by changes in their connectivity following long-term olfactory memory formation (Hourcade et al., 2010). A3v neurons feedback onto the calyces and could thus inhibit the input to KCs; this inhibition may be crucial to decrease their responses to odorants subject to a change in valence as in the transition between phases inherent to reversal learning.

This hypothesis is supported by findings in the fruit fly *Drosophila melanogaster* where the APL neurons are GABAergic and resemble the A3v cluster (Liu and Davis, 2009). Functional disruption of the APL-to-MB signaling using neurogenetic tools impairs visual reversal learning by impeding the specific suppression of the initial memory (Ren et al., 2012). A similar conclusion was reported for olfactory reversal learning in fruit flies (Wu et al., 2012) but this work did not verify whether second-phase olfactory acquisition was possible upon APL inhibition. Using a simple olfactory discrimination instead of reversal learning, Lin et al. (2014) showed that olfactory sparse coding in the MBs is due to the inhibitory feedback of APL neurons. Kenyon cells activate APL neurons and they inhibit in turn KCs. Disrupting the Kenyon cell-APL feedback loop decreases the sparseness of KCs odor responses, increases inter-odor correlations and prevents flies from learning to discriminate similar, but not dissimilar, odors. Thus, GABAergic feedback

inhibition to the calyces suppresses KCs activity to maintain sparse, decorrelated odor coding and thus the odor specificity of memories (Lin et al., 2014). While this mechanism may support the learning of each olfactory discrimination and thus solving each of the two consecutive phases of reversal learning, it may be particularly enhanced in the case of ambiguity of stimulus valence upon phase transition. As PCT FNs exhibit experience-dependent plasticity (Haehnel and Menzel, 2010), A3v neurons may enhance their inhibition to the learned stimuli in order to favor the reversal of stimulus valence.

Note that neither retrieval nor extinction were impaired by PTX injection so that ionotropic GABAergic inhibition affected a different computational process related to the capacity of inverting stimulus value. When a subject experiences a reversed CS-US contingency, a dual process occurs: a new excitatory learning of the formerly non-reinforced stimulus and a new inhibitory learning of the original CS-US association. In our experiments, PTX-injection into the calyces impaired inhibitory learning of the previous A-US association but not the excitatory learning of the new B-US association, which occurred in a similar way as in the PBS-injected group (see **Figure 3**). Concluding that extinction learning is the process specifically targeted by PTX, independently of excitatory learning, is, however, incautious as shown by the extinction experiment (A^+ vs. $B^- \rightarrow A^-$ and B^-) in which extinction was preserved and similar both in the PTX- and the PBS-injected bees (see **Figure 6**). In this case, the level of ambiguity of stimulus outcome was only partial as a change in stimulus valence occurred for A but not for B. It thus seems more appropriate to suggest that inhibition of GABAergic ionotropic receptors affected the reversal process in a situation of full reversal (i.e., of full ambiguity of stimulus outcome). This hypothesis implies that the excitatory and inhibitory learning involved in the reversal phase might not be fully independent.

All in all, these results suggest that the inhibitory regulation of KCs activity by GABAergic FNs constitutes a generalized mechanism and has a major role in the resolution of conflicting contingencies, thus supporting the resolution of ambiguous tasks.

GABAergic Feedback Neurons and MBs are Necessary for Solving Ambiguous Learning Tasks, but are Dispensable for Elementary Discriminations

Previous work using procaine-blockade of MBs Na^+ and K^+ channels showed that bee MBs are necessary for olfactory reversal learning but are dispensable for learning two consecutive simple olfactory discriminations (Devaud et al., 2007). Our experiments replicated these findings and identified the GABAergic A3v neurons of the MBs as a likely substrate of this effect. Both works thus coincide in the demonstration that MBs, which are definitely a site for storage and retrieval of elemental olfactory memories (Menzel, 1999; Menzel et al., 2001), may be replaced by other structures for acquiring simple forms of learning. A similar conclusion was reached in other studies (Malun et al., 2002; Komischke et al., 2005) that showed that simple olfactory discriminations were possible despite partial MBs ablation by

larval treatment with hydroxyurea. Taken together, these results reveal a principle of redundancy in memory formation in the honey bee brain and point out that structures such as the ALs may be alternate sites for the storage and eventual retrieval of olfactory memories induced by simple learning tasks. Indeed, calcium imaging experiments have shown short-term changes in neural activity for a rewarded odorant following learning of a simple olfactory discrimination (Faber et al., 1999). The long-term, simple absolute conditioning with a single odorant paired with sugar also induces structural changes in ALs (Hourcade et al., 2009). Such redundancy is a main difference between bees and flies, as in *Drosophila* functional MBs have been repeatedly shown to be necessary for olfactory learning and memory, even of simple discrimination tasks (Heisenberg, 2003; Gerber et al., 2004; Krashes et al., 2007; Wang et al., 2008).

Reversal learning exhibits only a transient ambiguity of stimulus outcome that occurs at the transition between the two consecutive conditioning phases. Other learning tasks presenting ambiguity of stimulus outcome to a larger extent may also require MB integrity, and more specifically GABAergic feedback signaling from the lobes to the calyces (Giurfa, 2003, 2007). For instance, the unique capacity of honey bees to solve ambiguous patterning discriminations (e.g., positive patterning: A^- , B^- vs. AB^+ ; negative patterning: A^+ , B^+ vs. AB^- ; Deisig et al., 2001, 2002, 2003) where each stimulus is as often rewarded as non-rewarded, may rely on MBs and GABAergic

FN signaling. From this perspective, MBs might be necessary during the acquisition of “complex” tasks, i.e., those requiring the resolution of contradictory CS-US associations. Further experiments combining conditioning protocols such as the negative/positive patterning and MB/feedback-neuron blockade will provide insight into this hypothesis.

Author contributions

All authors (CB, JMD, GI, MG) substantially contributed to the conception of the work, and the analysis and interpretation of data. All of them also contributed in revising the work critically for important intellectual content, and approving the version to be published. They all agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved. CB also contributed to the acquisition of data, CB and MG drafted the work.

Acknowledgments

This work was supported by the French National Research Agency (Project MINICOG), the Human Frontier Science Program (HFSP), the French Research Council (CNRS) and the University Paul Sabatier of Toulouse. MG thanks the support of the Institut Universitaire de France (IUF) and GI the CNRS for the support of his Excellence Chair.

References

- Barbara, G. S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M., and Grünewald, B. (2005). Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 191, 823–836. doi: 10.1007/s00359-005-0007-3
- Ben-Shahar, Y., Thompson, C. K., Hartz, S. M., Smith, B. H., and Robinson, G. E. (2000). Differences in performance on a reversal learning test and division of labor in honey bee colonies. *Anim. Cogn.* 2, 119–125. doi: 10.1007/s100710000068
- Bicker, G. (1999). Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microsc. Res. Tech.* 45, 174–183. doi: 10.1002/(sici)1097-0029(19990501)45:3<174:aid-jemt5>3.3.co;2-l
- Bicker, G., Schäfer, S., and Kingan, T. G. (1985). Mushroom body feedback interneurons in the honeybee show GABA-like immunoreactivity. *Brain Res.* 360, 394–397. doi: 10.1016/0006-8993(85)91262-4
- Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A., and Schäfer, S. (1983). Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97, 107–119. doi: 10.1037/0735-7036.97.2.107
- Blankenburg, S., Balfanz, S., Hayashi, Y., Shigenobu, S., Miura, T., Baumann, O., et al. (2015). Cockroach GABAB receptor subtypes: molecular characterization, pharmacological properties and tissue distribution. *Neuropharmacology* 88, 134–144. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.08.022
- Boumghar, K., Couret-Fauvel, T., Garcia, M., and Armengaud, C. (2012). Evidence for a role of GABA- and glutamate-gated chloride channels in olfactory memory. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103, 69–75. doi: 10.1016/j.pbb.2012.08.001
- Buckingham, S. D., Biggin, P. C., Sattelle, B. M., Brown, L. A., and Sattelle, D. B. (2005). Insect GABA receptors: splicing, editing and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol. Pharmacol.* 68, 942–951. doi: 10.1124/mol.105.015313
- D’Agostino, R. B. (1971). A second look at analysis of variance on dichotomous data. *J. Educ. Meas.* 8, 327–333. doi: 10.1111/j.1745-3984.1971.tb00947.x
- de Brito Sanchez, M. G., Serre, M., Avarguès-Weber, A., Dyer, A. G., and Giurfa, M. (2015). Learning context modulates aversive taste strength in honey bees. *J. Exp. Biol.* 218, 949–959. doi: 10.1242/jeb.117333
- Deisig, N., Lachnit, H., and Giurfa, M. (2002). The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learn. Mem.* 9, 112–121. doi: 10.1101/lm.41002
- Deisig, N., Lachnit, H., Giurfa, M., and Hellstern, F. (2001). Configural olfactory learning in honeybees: negative and positive patterning discrimination. *Learn. Mem.* 8, 70–78. doi: 10.1101/lm.8.2.70
- Deisig, N., Lachnit, H., Sandoz, J. C., Lober, K., and Giurfa, M. (2003). A modified version of the unique cue theory accounts for olfactory compound processing in honeybees. *Learn. Mem.* 10, 199–208. doi: 10.1101/lm.55803
- Devaud, J.-M., Blunk, A., Podufall, J., Giurfa, M., and Grünewald, B. (2007). Using local anaesthetics to block neuronal activity and map specific learning tasks to the mushroom bodies of an insect brain. *Eur. J. Neurosci.* 26, 3193–3206. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05904.x
- Dupuis, J. P., Bazelot, M., Barbara, G. S., Paute, S., Gauthier, M., and Raymond-Delpech, V. (2010). Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the honeybee antennal lobes: two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *J. Neurophysiol.* 103, 458–468. doi: 10.1152/jn.00798.2009
- Dusek, J. A., and Eichenbaum, H. (1997). The hippocampus and memory for orderly stimulus relations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 7109–7114. doi: 10.1073/pnas.94.13.7109
- Enell, L., Hamasaka, Y., Kolodziejczyk, A., and Nässel, D. R. (2007). γ -Aminobutyric acid (GABA) signaling components in *drosophila*: immunocytochemical localization of GABAB receptors in relation to the GABAA receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *J. Comp. Neurol.* 505, 18–31. doi: 10.1002/cne.21472

- Faber, T., Joerges, J., and Menzel, R. (1999). Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nat. Neurosci.* 2, 74–78. doi: 10.1038/4576
- Froese, A., Szyszka, P., and Menzel, R. (2014). Effect of GABAergic inhibition on odorant concentration coding in mushroom body intrinsic neurons of the honeybee. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 200, 183–195. doi: 10.1007/s00359-013-0877-8
- Ganeshina, O., and Menzel, R. (2001). GABA-immunoreactive neurons in the mushroom bodies of the honeybee: an electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 437, 335–349. doi: 10.1002/cne.1287
- Gerber, B., Tanimoto, H., and Heisenberg, M. (2004). An engram found? Evaluating the evidence from fruit flies. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 737–744. doi: 10.1016/j.conb.2004.10.014
- Giurfa, M. (2003). Cognitive neuroethology: dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 726–735. doi: 10.1016/j.conb.2003.10.015
- Giurfa, M. (2007). Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 193, 801–824. doi: 10.1007/s00359-007-0235-9
- Giurfa, M., and Sandoz, J.-C. (2012). Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learn. Mem.* 19, 54–66. doi: 10.1101/lm.024711.111
- Gronenberg, W. (1987). Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *Exp. Biol.* 46, 115–125.
- Grünewald, B. (1999a). Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 185, 565–576. doi: 10.1007/s003590050417
- Grünewald, B. (1999b). Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 404, 114–126. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19990201)404:1<114::aid-cne9>3.3.co;2-r
- Hadar, R., and Menzel, R. (2010). Memory formation in reversal learning of the honeybee. *Front. Behav. Neurosci.* 4:186. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00186
- Haehnel, M., and Menzel, R. (2010). Sensory representation and learning-related plasticity in mushroom body extrinsic feedback neurons of the protocerebral tract. *Front. Syst. Neurosci.* 4:161. doi: 10.3389/fnsys.2010.00161
- Hammer, M. (1993). An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* 366, 59–63. doi: 10.1038/366059a0
- Heisenberg, M. (2003). Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 266–275. doi: 10.1038/nrn1074
- Hosie, A. M., Aronstein, K., Sattelle, D. B., and French-Constant, R. H. (1997). Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci.* 20, 578–583. doi: 10.1016/s0166-2236(97)01127-2
- Hourcade, B., Muenz, T. S., Sandoz, J.-C., Rössler, W., and Devaud, J.-M. (2010). Long-term memory leads to synaptic reorganization in the mushroom bodies: a memory trace in the insect brain?. *J. Neurosci.* 30, 6461–6465. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0841-10.2010
- Hourcade, B., Perisse, E., Devaud, J.-M., and Sandoz, J.-C. (2009). Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. *Learn. Mem.* 16, 607–615. doi: 10.1101/lm.1445609
- Kirschner, S., Kleineidam, C. J., Zube, C., Rybak, J., Grünewald, B., and Rössler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Comp. Neurol.* 499, 933–952. doi: 10.1002/cne.21158
- Kiya, T., and Kubo, T. (2010). Analysis of GABAergic and non-GABAergic neuron activity in the optic lobes of the forager and re-orienting worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *PLoS One* 5:e8833. doi: 10.1371/journal.pone.0008833
- Komischke, B., Giurfa, M., Lachnit, H., and Malun, D. (2002). Successive olfactory reversal learning in honeybees. *Learn. Mem.* 9, 122–129. doi: 10.1101/lm.44602
- Komischke, B., Sandoz, J.-C., Malun, D., and Giurfa, M. (2005). Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *Eur. J. Neurosci.* 21, 477–485. doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.03879.x
- Krashes, M. J., Keene, A. C., Leung, B., Armstrong, J. D., and Waddell, S. (2007). Sequential use of mushroom body neuron subsets during *Drosophila* odor memory processing. *Neuron* 53, 103–115. doi: 10.1016/j.neuron.2006.11.021
- Leitch, B., and Laurent, G. (1996). GABAergic synapses in the antennal lobe and mushroom body of the locust olfactory system. *J. Comp. Neurol.* 372, 487–514. doi: 10.1002/(sici)1096-9861(19960902)372:4<487::aid-cne1>3.3.co;2-4
- Lin, A. C., Bygrave, A. M., de Calignon, A., Lee, T., and Miesenböck, G. (2014). Sparse, decorrelated odor coding in the mushroom body enhances learned odor discrimination. *Nat. Neurosci.* 17, 559–568. doi: 10.1038/nn.3660
- Liu, X., and Davis, R. L. (2009). The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nat. Neurosci.* 12, 53–59. doi: 10.1038/nn.2235
- Liu, X., Krause, W. C., and Davis, R. L. (2007). GABA receptor RDL inhibits *Drosophila* olfactory associative learning. *Neuron* 56, 1090–1102. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.036
- Lozano, V. C., Armengaud, C., and Gauthier, M. (2001). Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 187, 249–254. doi: 10.1007/s003590100196
- Lunney, G. H. (1970). Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable: an empirical study. *J. Educ. Meas.* 7, 263–269. doi: 10.1111/j.1745-3984.1970.tb00727.x
- MacLeod, K., and Laurent, G. (1996). Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* 274, 976–979. doi: 10.1126/science.274.5289.976
- Malun, D., Giurfa, M., Galizia, C. G., Plath, N., Brandt, R., Gerber, B., et al. (2002). Hydroxyurea-induced partial mushroom body ablation does not affect acquisition and retention of olfactory differential conditioning in honeybees. *J. Neurobiol.* 53, 343–360. doi: 10.1002/neu.10119
- Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C., and Giurfa, M. (2012). Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees: a step toward standardized procedures. *J. Neurosci. Methods* 211, 159–167. doi: 10.1016/j.jneumeth.2012.08.018
- Menzel, R. (1999). Memory dynamics in the honeybee. *J. Comp. Physiol. A* 185, 323–340. doi: 10.1007/s003590050392
- Menzel, R., Manz, G., Menzel, R., and Greggers, U. (2001). Massed and spaced learning in honeybees: the role of CS, US, the intertrial interval and the test interval. *Learn. Mem.* 8, 198–208. doi: 10.1101/lm.40001
- Menzel, R. (2014). The insect mushroom body, an experience-dependent recoding device. *J. Physiol. Paris* 108, 84–95. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.07.004
- Mota, T., and Giurfa, M. (2010). Multiple reversal olfactory learning in honeybees. *Front. Behav. Neurosci.* 4:48. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00048
- Mwilaria, E. K., Ghatak, C., and Daly, K. C. (2008). Disruption of GABA in the insect antennal lobe generally increases odor detection and discrimination thresholds. *Chem. Senses* 33, 267–281. doi: 10.1093/chemse/bjm085
- Okada, R., Rybak, J., Manz, G., and Menzel, R. (2007). Learning-related plasticity in pe1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the honeybee brain. *J. Neurosci.* 27, 11736–11747. doi: 10.1523/jneurosci.2216-07.2007
- Pamir, E., Chakroborty, N. K., Stollhoff, N., Gehring, K. B., Antemann, V., Morgenstern, L., et al. (2011). Average group behavior does not represent individual behavior in classical conditioning of the honeybee. *Learn. Mem.* 18, 733–741. doi: 10.1101/lm.2232711
- Raccuglia, D., and Mueller, U. (2013). Focal uncaging of GABA reveals a temporally defined role for GABAergic inhibition during appetitive associative olfactory conditioning in honeybees. *Learn. Mem.* 20, 410–416. doi: 10.1101/lm.030205.112
- Ren, Q., Li, H., Wu, Y., Ren, J., and Guo, A. (2012). A GABAergic inhibitory neural circuit regulates visual reversal learning in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 32, 11524–11538. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0827-12.2012
- Rescorla, R. A., and Wagner, A. R. (1972). “A theory of pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement,” in *Classical Conditioning II Current Theory and Research*, eds A. H. Black, W. F. Prokasy (New York: Appleton-Century-Crofts), 64–99.
- Roussel, E., Sandoz, J.-C., and Giurfa, M. (2010). Searching for learning-dependent changes in the antennal lobe: simultaneous recording of neural activity and aversive olfactory learning in honeybees. *Front. Behav. Neurosci.* 4:155. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00155

- Rudy, J. W., Barrientos, R. M., and O'Reilly, R. C. (2002). Hippocampal formation supports conditioning to memory of a context. *Behav. Neurosci.* 116, 530–538. doi: 10.1037/0735-7044.116.4.530
- Rudy, J. W., and O'Reilly, R. C. (1999). Contextual fear conditioning, conjunctive representations, pattern completion and the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 113, 867–880. doi: 10.1037/0735-7044.113.5.867
- Rudy, J. W., and O'Reilly, R. C. (2001). Conjunctive representations, the hippocampus and contextual fear conditioning. *Cogn. Affect. Behav. Neurosci.* 1, 66–82. doi: 10.3758/cabn.1.1.66
- Rudy, J. W., and Sutherland, R. J. (1989). The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behav. Brain Res.* 34, 97–109. doi: 10.1016/s0166-4328(89)80093-2
- Rybak, J., and Menzel, R. (1993). Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain: the neuronal connections of the alpha-lobe. *J. Comp. Neurol.* 334, 444–465. doi: 10.1002/cne.903340309
- Sachse, S., and Galizia, C. G. (2002). Role of inhibition for temporal and spatial odor representation in olfactory output neurons: a calcium imaging study. *J. Neurophysiol.* 87, 1106–1117.
- Sattelle, D. B., Lummis, S. C., Wong, J. F., and Rauh, J. J. (1991). Pharmacology of insect GABA receptors. *Neurochem. Res.* 16, 363–374. doi: 10.1007/bf00966100
- Schäfer, S., and Bicker, G. (1986). Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *J. Comp. Neurol.* 246, 287–300. doi: 10.1002/cne.902460302
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H., and Laurent, G. (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 390, 70–74. doi: 10.1038/36335
- Stupien, G., Florian, C., and Roulet, P. (2003). Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80, 32–41. doi: 10.1016/s1074-7427(03)00022-4
- Sutherland, R. J., and Rudy, J. W. (1989). Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. *Psychobiol.* 17, 129–144.
- Wang, Y., Mamiya, A., Chiang, A.-S., and Zhong, Y. (2008). Imaging of an early memory trace in the drosophila mushroom body. *J. Neurosci.* 28, 4368–4376. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2958-07.2008
- Wilson, R. I., and Laurent, G. (2005). Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the drosophila antennal lobe. *J. Neurosci.* 25, 9069–9079. doi: 10.1523/jneurosci.2070-05.2005
- Wu, Y., Ren, Q., Li, H., and Guo, A. (2012). The GABAergic anterior paired lateral neurons facilitate olfactory reversal learning in drosophila. *Learn. Mem.* 19, 478–486. doi: 10.1101/lm.025726.112

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Boitard, Devaud, Isabel and Giurfa. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Feature-negative discrimination learning requires GABAergic feedback signaling in the mushroom bodies of the honey bee

Constance Boitard^{1,2}, Hélène Gauchez^{1,2}, Jean-Marc Devaud^{1,2}, Guillaume
Isabel^{1,2}, Martin Giurfa^{1,2}.

Soumis le 18 juin 2015   Learning and Memory.

**1 - Université de Toulouse, UPS, Centre de Recherches sur la Cog-
nition Animale, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9,
France.**

**2 - CNRS, Centre de Recherches sur la Cognition Animale, 118 route
de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France**

Abstract

In a feature-negative discrimination (FN), subjects learn to discriminate a reinforced stimulus A^+ from a non-reinforced binary compound AB^- including A and a different stimulus B termed feature (A^+ vs. AB^-). Stimulus B is unambiguous but stimulus A is ambiguous as it is as often reinforced as non-reinforced. FN has received much attention in learning studies as elemental, configural and occasion-setting theories have been proposed to account for its acquisition. Here we studied the neural bases of FN discrimination in honey bees, using appetitive and aversive olfactory conditioning. We asked if FN depends on the mushroom bodies, higher-order structures of the bee brain, and more specifically on GABAergic feedback signaling in these structures. Our results show that bees learn and memorize a FN discrimination in the olfactory domain and that comparable performances are found using an appetitive or an aversive reinforcement. Moreover, FN learning depends on GABAergic feedback signaling at the calyces, the input region of the mushroom bodies, as blockade of GABAergic signaling at this level impedes FN discrimination but leaves intact the capacity to solve an elemental olfactory discrimination lacking stimulus ambiguity (A^+ vs. BC^-). The differential requirement of GABAergic neurotransmission for FN compared to a purely elemental discrimination indicates that FN is not acquired following elemental rules. Taken together, these results highlight the fundamental role of mushroom bodies for higher-order ambiguous tasks and their dispensability for the acquisition of elemental

tasks.

Introduction

In the field of discrimination learning, the so-called feature-positive (FP) and feature-negative (FN) discriminations have attracted the attention of scholars of different disciplines such as experimental psychology and neurosciences. In both cases, a subject has to learn a discrimination between a reinforced and non-reinforced event, differing only by a feature. For instance, in FP, which was first described by Sainsbury and Jenkins in their experiments on pigeon learning [1, 2], the subject needs to learn the discrimination between a non-reinforced stimulus A and a reinforced binary compound including A and an additional stimulus B, which is thus the feature (i.e. A^- vs. AB^+). In FN, which is usually viewed as the opposite of FP [3], the reversed problem is presented, i.e. a discrimination between a reinforced single stimulus A and a non-reinforced binary compound AB (i.e. A^+ vs. AB^-) [1]. The question of what animals learn in these discriminations admits various answers, with different perceptual and cognitive implications. Elemental and non-elemental accounts of FP and FN have been proposed, which differ in the nature of associations established upon learning. An elemental account positing that animals learn the discrimination in terms of the association established between each stimulus element and its associated reinforcement (or absence of it) [4], maintains that focus on B brings an elemental solution to the problem. As stimulus

A has an ambiguous valence, being as often reinforced and non-reinforced, B alone suffices to respond appropriately. In FP, B acts as a conditioned excitor being always reinforced while in FN, B acts as a conditioned inhibitor being always non-reinforced. Non-elemental views may either adopt a configural or an occasion-setting explanation. For the former (Pearce 1987; Pearce 1994), the compound AB constitutes a unique configuration (X) that is only partially or totally unrelated to its elements. Discrimination becomes then straightforward as it opposes A to X. For the latter, B acts as an occasion setter signaling that a conditioned stimulus A will be or not reinforced without entering itself in direct association with reinforcement [5]. Several works using different species such as pigeons, rats, cats, monkeys and humans, among others, have reported that FN is usually more difficult than FP [1, 6–11]. Here we focused on FN to study its neural bases in honey bees. Honey bees are a well-established model for the study of learning and memory [12, 13]. Extensive studies on discrimination learning have been performed in the laboratory using Pavlovian appetitive and aversive conditioning protocols, which rely on the proboscis extension response (PER) and the sting extension response (SER), respectively. In the olfactory appetitive PER conditioning, a hungry bee learns to associate an odorant (the conditioned stimulus or CS) with a drop of sucrose solution delivered to the antennae and the proboscis (the unconditioned stimulus or US); the bee having learned this association extends afterwards the proboscis to the odorant anticipating the food reward [14, 15]. In the olfactory

aversive SER conditioning, a bee learns the association between an odorant (the CS) and a mild electric shock (the US) so that it extends afterwards the sting upon odorant presentation [16–18]. In the bee, mushroom bodies (MBs) are higher-order brain structures associated with memory storage and retrieval [12,15,19]. They are also crucial for achieving different forms of ambiguous discriminations such as reversal learning or patterning discriminations [20,21]. Pharmacological blocking of these brain structures abolishes the capacity to master non-elemental forms of olfactory learning but leaves intact the capacity to achieve elemental olfactory discriminations. We thus reasoned that FN could also depend on mushroom body integrity if processed by the bees as a non-elemental (e.g. configural) discrimination. On the contrary, FN would be possible despite mushroom body blockade if treated as a purely elemental discrimination. Here we focused on recurrent inhibitory feedback circuits in the mushroom bodies of the honey bee [22–25] as a possible mechanism to inhibit responses to ambiguous olfactory signals. Two main GABAergic circuits provided by A3v and A3d neurons innervate the output region of the mushroom bodies (the lobes) and feedback either onto the input region, the calyces (A3v neurons), or onto the lobes themselves (A3d neurons). We reasoned that these circuits might be crucial to inhibit responses in ambiguous olfactory discriminations. We thus blocked GABAergic signaling in the MBs during FN by locally injecting an antagonist of ionotropic GABA receptors, into the calyces or the lobes. We took advantage of the protocols of appetitive PER and aver-

sive SER conditioning and asked if honey bees master a FN discrimination in the olfactory domain, and if the nature of the reinforcement used, appetitive or aversive, has an impact on the strategy used by the animals to solve the FN problem. Moreover, we determined if this discrimination learning depends on mushroom body integrity, and more specifically, on GABAergic feedback signaling in the mushroom bodies.

Results

Appetitive olfactory PER conditioning : GABAergic signaling in the calyces is required for feature-negative (A^+ vs. AB^{+-}) discrimination

In a first experiment, we used the appetitive PER protocol and conditioned bees previously injected in the calyces of the mushroom bodies with a control solution of PBS ($n = 55$) or with the GABA-receptor antagonist Picrotoxin (PTX; $n = 55$). Both groups were subject to a FN discrimination using two odorants, limonene and eugenol. Bees were thus trained to discriminate A^+ from AB^- , with limonene and eugenol being balanced in terms of their role as A or B, during 16 trials (8 A^+ and 8 AB^- trials) spaced by 8 min. Reinforced and non-reinforced trials were interspersed following a pseudo-random sequence. A retention test in which A and AB were delivered without sucrose reinforcement was performed 1 h after the end of conditioning. PBS-injected bees learned to

discriminate the single reinforced odorant A^+ from the non-reinforced compound AB^- (ANOVA for repeated measurements; factor odor : $F_{1,54} = 3.96$, $P = 0.05$; interaction odor x trials : $F_{8,54} = 7.61$, $P < 0.001$) and were thus able to solve the FN discrimination (Fig. 1A). Discrimination was highly significant in the last conditioning trial (Tukey test : $P < 0.001$), thus showing that at the end of training bees learned to differentiate the reinforced odorant from the non-reinforced compound. One hour later, PBS-injected bees exhibited a low but significant tendency to remember the discrimination learned and responded more to the reinforced odorant than to the non-reinforced compound ($F_{1,54} = 5.93$, $P < 0.05$). On the contrary, PTX-injected bees (Fig. 1B) were unable to learn the discrimination (factor odor : $F_{1,54} = 0.28$, $P > 0.05$; interaction odor x trials : $F_{(8, 54)} = 1.52$, $P > 0.05$) and exhibited in consequence no significant retention ($F_{(1, 54)} = 2.87$, $P > 0.05$). In control experiments ($n = 52$, not shown), we increased the number of trials from 16 to 20 to determine if PTX injection would simply delay (instead of impeding) the solving of the FN discrimination but the results obtained were identical to those shown in Figs 1A,B. Our results thus show that the injection procedure itself did not impair significantly the capacity to master a FN discrimination, as shown by the performance of PBS bees in the appetitive olfactory protocol, and that inhibition of ionotropic GABA receptors at the level of the calyces via PTX suppresses the capacity to achieve a FN discrimination.

Appetitive olfactory PER conditioning : GABAergic signaling in the calyces is not required for an elemental A^+ vs. BC^- discrimination

In a second experiment we asked if mushroom bodies, and more specific GABAergic feedback signaling to the calyces, are also required for an olfactory discrimination reproducing the single odorant vs. binary compound opposition of the FN but excluding any ambiguity at the level of the single odorants. To this end, bees were trained to discriminate a rewarded odorant A^+ from a non-rewarded compound BC^- , introducing therefore a third odorant, 1-nonanol, besides limonene and eugenol. In this way, the discrimination problem becomes purely elemental, as each odorant is unambiguously associated with the presence or absence of sucrose reward (A^+ , B^- , C^-). One hour after the end of conditioning, the retention test was performed as before. Figures 1C,D show that both PBS- ($n = 43$) and PTX-injected bees ($n = 43$) learned the discrimination and responded significantly more to the rewarded odorant A than to the non-rewarded compound BC at the end of conditioning (factor odor ; PBS group : $F(1, 42) = 69.79$, $P < 0.001$; PTX group : $F(1, 42) = 50.74$, $P < 0.001$; interaction odor x trials ; PBS group : $F(8, 42) = 22.51$, $P < 0.001$; PTX group : $F(8, 42) = 17.56$, $P < 0.001$). Both groups reached a significant discrimination in the last conditioning trial (Tukey test, $P < 0.001$ in both cases) and exhibited significant retention one hour after conditioning (PBS group : $F(1, 42) = 40.09$, $P < 0.001$; PTX group : $F(1, 42) = 36.52$, $P < 0.001$).

Thus, contrary to the previous experiment, blockade of GABAergic signaling did not affect a single odorant vs. binary compound discrimination.

Appetitive olfactory PER conditioning : GABAergic signaling in the lobes is not required for feature-negative (A^+ vs. AB^-) discrimination

In the honey bee brain, inhibitory GABAergic feedback to the mushroom bodies occurs not only at the level of the calyces but also at the levels of the lobes [22, 24, 26, 27]. While our previous experiments targeted GABAergic signaling into the calyces, GABAergic signaling to the lobes could also be important for FN discrimination. To study this possibility, we performed a third experiment in which we coupled FN conditioning with an injection of either PBS or PTX into the vertical lobes of the mushroom bodies. The injection was performed as in the previous experiments, 15 min before conditioning. Both PBS- ($n = 42$) and PTX-injected bees ($n = 42$) learned the FN discrimination (Figs. 2A,B; factor odor; PBS group : $F(1, 41) = 6.27$, $P < 0.05$; PTX group : $F(1, 41) = 8.55$, $P < 0.01$; interaction odor x trials; PBS group : $F(8, 41) = 4.11$, $P < 0.001$; PTX group : $F(8, 41) = 6.39$, $P < 0.001$) and exhibited significant discrimination at the end of conditioning (Tukey test, $P < 0.05$ in both cases). Both groups also remembered the FN discrimination one hour after conditioning (PBS group : $F(1, 41) = 14.54$, $P < 0.001$; PTX group : $F(1, 41) = 16.40$, $P < 0.001$) so that no effect of PTX on FN learning

and retention could be observed when this drug was injected in the lobes of the mushroom bodies. A similar result was obtained when PTX was injected before and elemental discrimination A^+ vs. BC^- (not shown), which preserved the necessity to discriminate a single reinforced odorant from a non-reinforced binary compound but which presented no ambiguity at the single-odorant level. These results thus show that GABAergic feedback signaling at the level of the lobes of the mushroom bodies is neither relevant for the resolution of a FN discrimination nor for an elemental olfactory discrimination. No further experiment with injection into the lobes was therefore performed, given the lack of effect observed. We conclude that GABAergic neurotransmission is crucial for FN at the level of the calyces, the main input region of the mushroom bodies, but not at the level of their output region, the lobes. In addition, this experiment shows that the drug injected does not diffuse beyond the region of the mushroom bodies targeted as demonstrated by the different results obtained upon injection into the calyces vs. the lobes.

Aversive olfactory SER conditioning : GABAergic signaling in the calyces is required for feature-negative (A^+ vs. AB^-) discrimination

In a fourth experiment, we used the aversive SER conditioning protocol to determine if bees previously injected in the calyces of the mushroom bodies with a control solution of PBS ($n = 55$) or with PTX ($n = 55$) were able to

learn an olfactory FN discrimination in which the reinforcement was aversive (a 5.5 V electric shock) instead of being appetitive. Nine reinforced and nine non-reinforced trials, with an inter-trial interval of 10 min, were interspersed following a pseudorandom sequence in this conditioning protocol (18 trial in total). This experiment was particularly interesting, as no other work had attempted before to use an ambiguous conditioning protocol in SER conditioning. Figures 3A,B show the performance of the PBS- (n = 42) and the PTX-injected bees (n = 42). While PBS-injected bees learned the FN discrimination (factor odor; $F(1, 41) = 17.93$, $P < 0.001$; interaction odor x trials; PBS group : $F(9, 41) = 12.96$, $P < 0.001$), reached a highly significant discrimination in the last conditioning trial (Tukey test; $P < 0.001$) and remembered it one hour after the end of conditioning ($F(1, 41) = 20.50$, $P < 0.001$), PTX-injected bees failed in learning the FN discrimination (factor odor; $F(1, 41) = 0.38$, $P > 0.05$; interaction odor x trials; PBS group : $F(9, 41) = 0.51$, $P > 0.05$) and in consequence showed no retention ($F(1, 41) = 0.47$, $P > 0.05$). Thus, as in appetitive PER conditioning, bees learned the FN discrimination and GABAergic signaling at the level of the calyces was also necessary for solving the problem.

Aversive olfactory SER conditioning : GABAergic signaling in the calyces is not required for an elemental A^+ vs. BC^- discrimination

In a final experiment, we determined if GABAergic feedback signaling to the calyces is also required for an elemental olfactory discrimination between a single reinforced odorant A and a non-reinforced binary compound BC. This discrimination was purely elemental as each odorant was unambiguously associated with the presence or absence of electric shock (A^+ , B^- , C^-). One hour after the end of conditioning, a retention test was performed as before. Figures 3C,D show that both PBS- (n = 42) and PTX-injected bees (n = 42) learned the discrimination and responded significantly more to the punished odorant A than to the non-punished compound BC at the end of conditioning (factor odor ; PBS group : $F(1, 41) = 36.19$, $P < 0.001$; PTX group : $F(1, 41) = 30.65$, $P < 0.001$; interaction odor x trials ; PBS group : $F(9, 41) = 18.25$, $P < 0.001$; PTX group : $F(9, 41) = 19.47$, $P < 0.001$). Both groups reached a significant discrimination in the last conditioning trial (Tukey test, $P < 0.001$ in both cases) and exhibited significant retention one hour after conditioning (PBS group : $F(1, 41) = 33.87$, $P < 0.001$; PTX group : $F(1, 41) = 30.75$, $P < 0.001$). Thus, contrary to the previous experiment, blockade of GABAergic signaling did not affect a single odorant vs. binary compound discrimination in aversive SER conditioning. GABAergic blockade at the level of the calyces remains, however, indispensable for an olfactory FN discrimination, be it in the appetitive

or in the aversive conditioning modality.

Discussion

The present work studied the capacity of honey bees to learn and memorize a FN discrimination (A^+ vs. AB^-) in the olfactory domain, using both appetitive (sucrose solution) and aversive (electric shock) reinforcements. In parallel, we studied if this capacity depends on the mushroom bodies, and more specifically on GABAergic feedback signaling in these structures of the bee brain, which have been repeatedly associated with memory encoding, storage and retrieval of elemental learning problems [12, 19]. Our results show, not only that bees learn and remember a FN discrimination both in an appetitive and aversive conditioning protocol, but also that FN acquisition depends on GABAergic signaling at the level of the calyces – but not the lobes – of the mushroom bodies, contrary to a purely elemental task, which preserves the opposition between single reinforced odorant and non-reinforced binary compound but eliminates stimulus ambiguity (A^+ vs. BC^-). This difference clearly shows FN solving did not follow the principles of an elemental discrimination. Taken together, these results highlight the fundamental role of mushroom bodies for higher-order ambiguous tasks and their dispensability for the acquisition of purely elemental tasks.

Prior studies on feature-negative discrimination in honey bees

The capacity of bees to learn a FN discrimination has been previously studied using both free flying bees in a visual conditioning protocol [28] and harnessed bees in the olfactory PER conditioning protocol [29]. Both works present experimental deficits that raise doubts concerning the demonstration of FN solving. For instance, in the olfactory PER conditioning experiment (Chandra and Smith 1998), the FN discrimination was designed in such a way that besides delivering sucrose on target A, an aversive concentrated saline solution was also delivered upon AB presentation ; thus, appetitive and aversive reinforcements were delivered in the same protocol, a fact that confounds the nature of the discrimination proposed : for sucrose reinforcement, the task was indeed a FN discrimination (A^+ vs AB^- , with '+' indicating the presence of sucrose and '-' its absence), but for the saline reinforcement, the task was a FP discrimination (A^- vs. AB^+ , with '+' indicating the presence of saline solution and '-' its absence) [29]. A similar mistake was done in the visual discrimination experiment [28] as rewarded visual targets presented appetitive sucrose solution while 'non-rewarding' ones presented aversive saline solution. As a consequence, any FP discrimination was at the same time a FN discrimination (and vice versa) depending on which reinforcement is considered for the analysis. Interestingly, an additional control was performed in which saline solution was replaced by a neutral stimulus, water. In this case, FN and FP

designs did not have confounding FP and FN factors, respectively, but in the case of FN, bees were practically unable to learn the task as their performance hardly improved along FN trials. Besides these criticisms, the main problem raised by these two works is that none of them addressed the question of the strategy used by the bees to learn the discrimination so that it is impossible to determine whether bees applied an elemental or a non-elemental problem solving.

Feature-negative discrimination as a non-elemental learning problem

FN can be solved using three main processing strategies :

1) subjects may use a purely elemental strategy in which a compound AB is the linear sum of its components A and B ($AB = A + B$) [4] and in which each component enters in a separate association with reinforcement /absence of reinforcement ; for this account, the critical cue to respond appropriately on each trial is feature B [1]. Given the valence ambiguity characterizing stimulus A, which is as often reinforced as non-reinforced, B acts as a conditioned inhibitor, suppressing responses to the non-reinforced compound AB^- . FN is then reduced to a purely elemental problem in which subjects respond or not on the basis of the presence/absence of B^- . Clearly, bees did not treat the FN discrimination following this elemental strategy : blocking of GABAergic neurotransmission suppressed FN discrimination but left intact the capacity

to solve another elemental problem A^+ vs BC^- in which each stimulus had an unambiguous reinforcement outcome.

2) The second possible strategy is non-elemental as it proposes that the compound AB is processed in a configural manner, i.e. as a unique configuration (X) that is only partially or totally unrelated to its elements [30] [31]. Discrimination becomes then straightforward as it opposes A^+ to X^- . In this strategy, the entire configuration X (instead of A and B) is associated with the absence of reinforcement. If mushroom bodies assign a unique, configural entity to the compound AB [21, 32], then blockade of their GABAergic neurotransmission would suppress the possibility of solving the FN discrimination based on this strategy. This hypothesis is consistent with the actual results of our experiments.

3) The third possibility is to treat feature B as an occasion setter, i.e. as a stimulus signaling that the conditioned stimulus A will be followed or not by reinforcement without entering itself in direct association with reinforcement [5]; in our FN experiments, B would act as a negative occasion setter [33] signaling that A will not be followed by reinforcement. This strategy, akin to a contextual learning form, can also account for our results. If mushroom bodies encode contextual or occasion-setting cues [34], impairing their function would suppress FN resolution.

Thus, from the three possibilities, the two non-elemental accounts provide a better framework to understand the bees' performances in our experiments.

This conclusion sets the basis for understanding mushroom bodies as a brain structure enabling non-elemental forms of learning and processing.

Mushroom bodies as a neural substrate for non-elemental problem solving

Non-elemental tasks are considered as higher-order forms of associative learning due to their non-linearity and intrinsic stimulus ambiguity [35, 36]. Honeybees, like mammals, learn various forms of non-linear discriminations both in the visual [37, 38] and the olfactory domain [39–42]. An illustrative example is provided by patterning discriminations (positive patterning : A^+ , B^+ vs. AB^- , and negative patterning : A^- , B^- vs. AB^+), which honey bees learn in the olfactory domain using non-elemental strategies [39–42], a capacity that is absent in other insect models of learning and memory [43, 44]. Recent work [45] has shown that patterning discriminations can only be mastered by honey bees with fully functional mushroom bodies. Pharmacological blockade of these structures abolishes positive and negative patterning but preserves the acquisition of an elemental discrimination between single odors A and B and a compound CD with opposite valences (A, B vs. CD). This result confirmed previous hypotheses suggesting that mushroom bodies are a key structure for establishing non-elemental associations [13, 32, 46]. In consequence, as FN was processed as a non-elemental discrimination by bees, its dependence on mushroom bodies is understandable. It is, nonetheless, important to analyze

in the light of neurobiological evidence how mushroom bodies may support the two non-elemental strategies accounting for our FN results (see above). The configural account relies on the assumption that the neural representation of the olfactory compound is unique and somehow different from those of the constitutive odorants (see above). This hypothesis has been analyzed in calcium imaging studies of neural activity at different stages of the olfactory circuit of the honey bee [47, 48]. Recordings of projection neurons, which convey the olfactory message from the first olfactory neuropile, the antennal lobe, to the mushroom bodies show a departure from linearity upon compound stimulation at the level of the mushroom bodies but not upstream [48]. It was, therefore, suggested that compound uniqueness arises at the level of the mushroom bodies through the inhibitory signaling provided by GABAergic feedback neurons of the protocerebro-calycal tract (PCT) [45] [49]. These neurons, organized in two main tracts, the A3v and the A3d neurons, both getting input signals from the mushroom body lobes and providing an inhibitory feedback to the calyces (A3v) or the lobes themselves (A3d) [24–26], may inhibit responses to irrelevant information [50, 51], thereby enhancing attention to relevant cues or relations [52, 53]. These feedback loops may thus allow the separation between single-odor and compound representations, attributing thereby a unique neural signature to each and enabling FN solving. In this scenario, blockade of GABAergic signaling via PTX is expected to disrupt FN discrimination, which was indeed the case. The occasion-setting account presupposes that

feature B acts as an occasion setter, i.e. as a context signaling the lack of association between target A and reinforcement [33]. In occasion setting, animals learn to disambiguate an uncertain conditioned stimulus using alternative stimuli that do not enter into direct association with the unconditioned stimulus and which provide the context for appropriate responding. For instance, animals may learn to discriminate odor A reinforced from the same odor A non-reinforced if these two situations are signaled by different colors [54]. In FN, feature B would provide the context for not responding to A. Mushroom body extrinsic neurons (MENs), with broad input arborizations at the level of the vertical lobe, have the capacity to encode differently odor cues whose valence change with a light context, and the context itself. These neurons, which provide a readout of learning-dependent neural restructuring within the mushroom bodies, reduce their responses to a rewarded odor, whereas they increase their responses to the context [34]. It thus seems feasible that mushroom bodies encode feature B in a distinct manner from target A to provide the basis for an account-setting solution based on MENs responses. This interpretation can be, however discarded considering that GABAergic injections into the lobes did not impair FN solving. As MENs (at least some of them) are GABA-sensitive [55], injection of PTX should have disrupted the capacity to solve FN in an occasion-setting manner. Furthermore, occasion setters anticipate generally the target stimulus to be discriminated (forward pairing) and extend their duration beyond it to act as contextual cues [54]. Simultaneity of

target and occasion setter usually decreases learning, something that was not observed in the case of feature B, which was presented simultaneously with and had the same duration as target A. Thus, although the mushroom bodies have the capacity to provide the neural substrate for an occasion-setting solution to the FN problem, we feel inclined to favor the configural interpretation described in the previous paragraph. Our experiments showed that GABAergic ionotropic signaling to the calyces but not the lobes is necessary for FN solving. This result suggests that A3v neurons of the mushroom bodies, providing GABAergic feedback to the calyces, are the crucial neural substrate supporting FN solving. They could inhibit the input to the Kenyon cells, the constitutive cells of the mushroom bodies, and thus decrease their responses to the configural entity of the AB compound. The fact that PTX injections into the calyces, but not into the lobes, impaired FN learning not only serves as a powerful control for a targeted localization of the drug but also allows referring this result to a specific subset of GABAergic feedback neurons. Indeed, no forward GABAergic signaling to the calyces has been described, and GABAergic feedback in the MBs of the honey bee brain is provided by two tracts of FNs, the A3v cluster of the protocerebro-calycal tract (PCT), which connects vertical and medial lobes with the calyces [26], and the A3d cluster, which provides local feedback from the medial and vertical lobes to the vertical lobe, acting on MENs (see above) projecting to premotor neurons [55]. Our results indicate that from these two tracts, only the A3v cluster is necessary for achie-

ving ambiguous learning tasks through ionotropic GABA receptors. Further experiments combining conditioning protocols such as the negative/positive patterning and blockade of GABAergic signaling in the mushroom bodies will provide insight into this hypothesis.

GABAergic feedback neurons of the mushroom bodies are necessary for solving FN in a non-elemental manner but are dispensable for elementary discriminations : what are mushroom bodies for ?

An important, and apparently surprising, conclusion of our work is that mushroom bodies are dispensable for an elemental learning discrimination (A^+ vs. BC^-) which, contrary to FN, could be achieved under PTX blockade. Yet, this conclusion should not be surprising as prior findings demonstrated already the same dispensability of mushroom bodies for the acquisition and short-term, mid-term retention of elemental, linear discriminations. For instance, lesions of the mushroom bodies by means of hydroxyurea feeding during development did not suppress the bees' capacity to learn an elemental discrimination between an odorant rewarded with sucrose and a non-rewarded odorant (A^+ vs. B^- ; [56]); however, lesions were partial so that it can be always argued that learning was possible based on the non-affected regions of the mushroom bodies. This argument does not apply in the case of a complete blockade of mushroom body neurotransmission by means of procaine; in this case, bees subject to olfac-

tory PER conditioning were unable to master a reversal learning problem in which they first learned to discriminate A^+ from B^- and then A^- from B^+ in the second phase (i.e. A^+ vs. $B^- \rightarrow A^-$ vs. B^+); procaine injections into the mushroom bodies performed after the first phase impeded reversal learning in the second phase, but left intact the capacity to learn a new discrimination between two different odorants C and D (i.e. A^+ vs. $B^- \rightarrow C^+$ vs. D^-) [21]. It was therefore concluded that mushroom bodies are necessary for reversal learning as they would allow overcoming the transient ambiguity of stimulus valence occurring between both conditioning phases [21]. More recently, and consistently with this conclusion and the present work, it was shown that inhibition of ionotropic but not metabotropic GABAergic signaling into the calyces of the mushroom bodies impedes reversal learning, but leaves intact the capacity to perform two consecutive elemental olfactory discriminations with no stimulus ambiguity (A^+ vs. $B^- \rightarrow C^+$ vs. D^-). On the contrary, inhibition of ionotropic GABAergic signaling into the MB lobes had no effect on reversal learning (Boitard et.al). These results seem to be contradictory with the extensive research performed on mushroom bodies showing that they are definitely a site for storage and retrieval of elemental olfactory memories induced by simple forms of olfactory PER conditioning in honey bees, either absolute (A^+) or differential (A^+ vs. B^-) [12, 57]. Yet, careful analysis of experimental evidence shows that the contradiction is only apparent. In the works discussed in the previous paragraphs, neither acquisition nor short-term/mid-term

retention were impaired upon conditioning of elemental discriminations but no test of long-term retention was performed (i.e. at least 72 h after conditioning), probably due to low chances of long-term survival exhibited by animals operated to receive injections into the mushroom bodies. It is thus possible that mushroom body blockade, either via procaine or PTX, could have an effect on long-term memory (LTM) formation/retention consistent with the important role of mushroom bodies for LTM [12, 57]. If this is the case, the acquisition of simple learning forms and the earlier forms of memory derived from them would be mediated not only by mushroom bodies but also by other structures of the olfactory circuit, which could support these functions in the absence of mushroom bodies. Structures such as the antennal lobes may be alternative sites for the storage and eventual retrieval of olfactory memories induced by simple learning tasks as they are a site of convergence of olfactory (CS) and sucrose (US) information via the VUMmx1 neuron, which mediates US signaling in the bee brain and which contacts not only the mushroom bodies but also the antennal lobes and the lateral horn [58, 59]. Indeed, calcium imaging experiments have shown short-term changes in neural activity for a rewarded odorant following learning of a simple olfactory discrimination [60]. The long-term, simple absolute conditioning with a single odorant paired with sugar also induces learning-dependent structural changes in the antennal lobes [61]. Experiments in which odorant stimulation was paired with local injections of octopamine, the neurotransmitter mediating the reinforcement properties of

sucrose reward in the bee brain, show that a principle of redundancy exists between the antennal lobe and the mushroom bodies for olfactory learning and mid-term retention [62]. While pairing of odorant stimulations with octopamine injections in the antennal lobes induces robust behavioral acquisition and mid-term retention in the PER protocol (50 min after the end of conditioning), the same procedure performed at the level of the mushroom bodies does not yield evidence for acquisition but supports mid-term memory retention [62]. This difference shows that antennal lobes and mushroom bodies are independent loci of initial formation of olfactory memory and that memory in the mushroom bodies needs time to develop, whereas associative induction in the antennal lobes leads to memory much more quickly. Redundancy may be only partial as memory contents may differ between antennal lobes and mushroom bodies, in particular given the multisensory nature of mushroom bodies and their capacity to contextualize olfactory cues (see above). Such a redundancy is so far a main difference between bees and flies, as in *Drosophila* functional mushroom bodies have been repeatedly shown to be necessary both for olfactory learning and memory even in the case of simple discrimination tasks [63–65].

Material and Methods

Animal preparation

Female honey bee foragers (*Apis mellifera*) were captured at the entrance of the hive in the morning of each experimental day. To be handled properly, they were anaesthetized on ice for a few minutes until complete immobilization. They were then prepared for appetitive PER or aversive SER conditioning. In the case of appetitive PER conditioning, bees were harnessed individually in small metal tubes. Only the antennae and the mouthparts remained free to move [66]. In the case of aversive SER conditioning, bees were harnessed on individual holders designed for aversive stimulation via delivery of an electric shock [16, 17, 67]. Holders consisted of two brass plates fixed to a Plexiglas plate. Brass plates were connected to the output of the stimulator (60 Hz – AC current). The resistance measured between the two plates in the presence of the bee was 200-300 K ω . Conductance gel (Sigma gel 250g, Parker Laboratories, USA) diluted in distilled water (50%) was applied below the thorax to ensure efficient shock delivery. Room temperature was maintained at 25°C. Both for appetitive and aversive conditioning, low melting-point wax was used to immobilize the head and facilitate drug injection. As FN conditioning was combined with localized microinjections of the GABAergic antagonist PTX in the bee brain, a piece of cuticle was removed from the head to expose the brain and allow later injections. The brain was then accessible through a win-

dow located between the compound eyes, the antennae and the median ocellus. The piece of cuticle was then put back in its original position to avoid brain desiccation. Bees were fed with $5\mu\text{L}$ of sucrose solution (50% weight/weight) before being stored in a dark humid chamber at room temperature for 3 hours in order to allow recovery until the experiment.

Injections

Picrotoxin (PTX $5\mu\text{M}$, Sigma-Aldrich France) was used to block ionotropic GABA receptors [68]. We used the procedure established by Devaud et al. [21] for microinjections in the MBs of the honey bee. Briefly, PTX was dissolved in a phosphate buffer saline solution (PBS) which was also used as a control. The PBS (in mM) solution consisted of : sucrose, 160 ; glucose, 25 ; HEPES, 10 ; MgCl_2 , 4 ; NaCl, 130 ; KCl, 6 ; CaCl_2 , 5 (pH 6.7). Methylene blue (1 mM, Sigma-Aldrich France) was added to the solutions to visualize and control the success and correct location of injections. The volume of the injected solution was first calibrated by injecting the solution into a drop of mineral oil using a Malassez cell. Depending on the experiment, a volume of 0.5 nL of PTX or PBS was injected bilaterally, between the lateral and median calyces, or in the vertical lobes of the MBs using a pulled glass capillary (GC 100-10, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) connected to a pressure micro-injector (FemtoJet express, Eppendorf, France). The injection was performed 15 min before the start of FN conditioning. Pilot experiments were designed to de-

fine the concentration of PTX necessary to target efficiently ionotropic GABA receptors, while leaving intact the capacity to learn a simple olfactory discrimination. Three hours after opening a window in the head capsule and 15 min before conditioning, bees were injected in the MB calyces with either PBS or PTX, and subject to a classical differential conditioning with a rewarded odor A and an unrewarded odor B (A^+ vs. B^-). Three concentrations were assayed, each in an independent group of bees : 1 μM , 10 μM or 100 μM . The higher PTX concentration (100 μM) abolishes inhibitory GABAergic signaling when injected into the antennal lobes before a differential conditioning in honey bees [69], locusts [70], moths [71] and fruit flies [72]. Control bees injected with PBS learned the olfactory discrimination, while PTX-injected bees learned it at a concentration of 1 μM but not of 100 μM . The concentration of 10 μM yielded intermediate results (not shown). We thus chose a concentration of 5 μM PTX (between 1 and 10 μM) as a concentration ensuring efficient A^+ vs. B^- discrimination in our experiments (see also Boitard et al. [49]).

Experiments

After dissection, bees experienced a 3-h rest followed by an injection of PBS or PTX, either between the lateral and median calyces or in the vertical lobes. Conditioning started fifteen minutes after injection. Two types of experiments were performed : feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^-) and its elemental control, the non-ambiguous discrimination (A^+ vs. BC^-). Expe-

riments were performed using either the appetitive (PER conditioning) or the aversive protocol (SER conditioning). Odorants used were limonene [(R)-(+)-limonene 97%, Sigma-Aldrich France], eugenol (eugenol \geq 99%, Sigma-Aldrich France) and 1-heptanal (1-heptanal \geq 99%, Sigma-Aldrich France). Their roles as A, B or C were balanced. A retention test was performed one hour after the end of conditioning, in which the two odorants used were presented without reinforcement.

Conditioning procedure

Olfactory PER conditioning

We followed the standard procedure described in Matsumoto et al. [66]. In all experiments, only bees responding with a PER to the sucrose stimulus before conditioning and after the retention test were used. Each conditioning trial lasted 40 seconds, starting with the bee being positioned in front of the odor-delivery system sending a clean air flow at 90-100 mL/min. Fifteen seconds after the start of the trial, the odorant was delivered by a computer-controlled olfactometer during 4 sec by diverting the air flow through a syringe containing a filter paper soaked with 4 μ L of pure odorant (or through two syringes containing each odorant in the case of the mixture). To induce a PER in the case of the rewarded odor presentations, both antennae were simultaneously touched with a toothpick soaked with 50% (weight/weight) sucrose solution during 3 s, starting 3 s after the odor onset. Therefore, the inter-stimulus in-

terval was 3 s and the stimulus overlap was 1 s. Conditioning consisted of 8 rewarded and 8 non-rewarded trials presented in a pseudorandomized sequence (16 trials in total). The intertrial interval was 8 minutes. Tests followed the same dynamic as conditioning trials but no reward was delivered during odor presentation. The intertest interval was the same as the intertrial interval. The sequence of odorant presentations was randomized from bee to bee.

Olfactory SER conditioning

We followed the standard procedure described in Vergoz et al. [16]. In all experiments, only bees responding with a SER to the shock stimulus before conditioning and after the retention test were used. Each conditioning trial lasted 50 seconds. Odorant stimulation was performed manually using a 50 mL syringe containing a filter paper soaked with 5 μ L of pure odorant, or 5 μ L of each odorant in the case of the mixture. Twenty seconds after the start of the trial, the odorant was delivered during 5 sec. To induce a SER in the case of the punished odor presentations, a 5,5 V electrical shock was delivered by a computer-controlled stimulator (60 Hz – AC current) during 2 s, starting 3 s after the odor onset. Therefore, the inter-stimulus interval was 3 s and the stimulus overlap was 2 s. The conditioning consisted of 9 punished and 9 non-punished trials presented in a pseudorandomized sequence (18 trials in total). The intertrial interval was 10 minutes. Retention tests followed the same dynamic as conditioning trials but no shock was delivered during odor presentation. The intertest interval was the same as the intertrial interval. The

sequence of odorant presentations was randomized from bee to bee.

Data transformation and statistical analysis

All results are presented as percentages of bees exhibiting a proboscis or a sting extension response (PER or SER, respectively) to the conditioned odorants (% conditioned responses). The data met the conditions required to apply an ANOVA to a dichotomous dependent variable [73] and thus allowed the use of repeated-measurement ANOVA for comparisons between and within groups. A Tukey HSD post-hoc analysis was performed after ANOVA to detect statistical differences. All statistical analyses were performed using Statistica 7.1 (StatSoft France 2006).

Figures

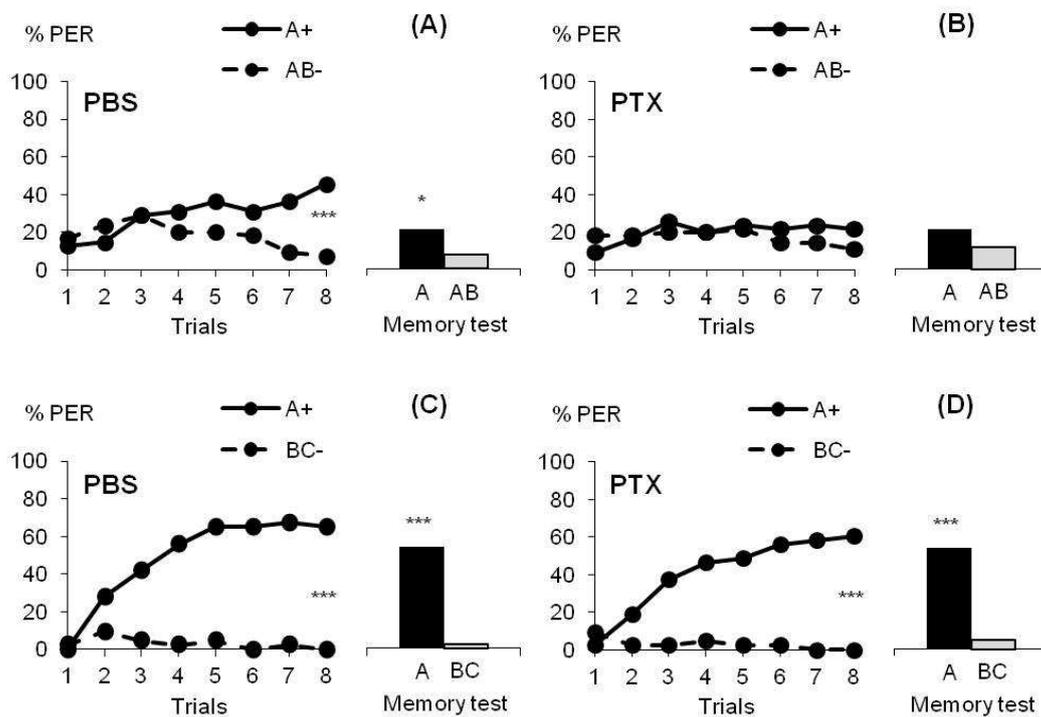


FIGURE 1 – Blockade of ionotropic GABA receptors in the calyces of the mushroom bodies impairs the acquisition of an appetitive feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^-) but not of an elemental discrimination (A^+ vs. BC^-). The figures show the percentage of conditioned proboscis extension responses (PER %) to the odorants during odor-sucrose trials and in a retention test. (A) Learning and retention of a feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^- ; A : solid line and black bar; AB : dashed line and grey bar) of a group of bees ($n = 55$) injected with PBS in the calyces of the mushroom bodies. (B) Same as in (A) but after injection of picrotoxin (PTX; $n = 55$). (C) Learning and retention of an elemental discrimination (A^+ vs. BC^- ; A : solid line and black bar; BC : dashed line and grey bar) of a group of bees ($n = 43$) injected with PBS in the calyces of the mushroom bodies. (D) Same as in (C) but after injection of PTX ($n = 43$). * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

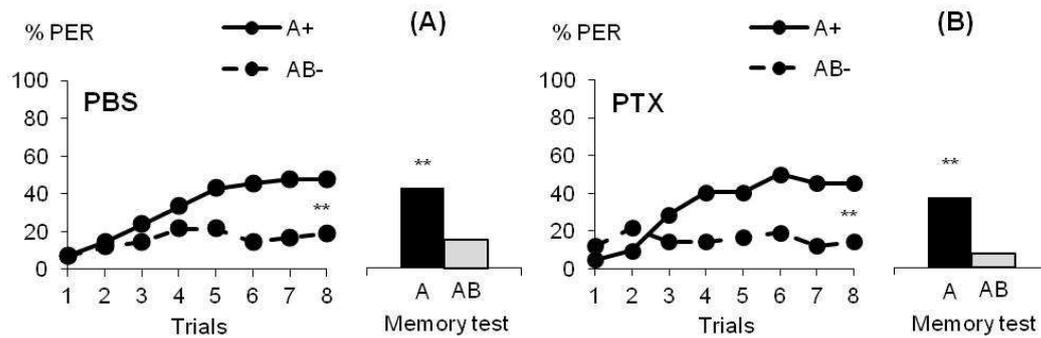


FIGURE 2 – Blockade of ionotropic GABA receptors in the lobes of the mushroom bodies does not impair the acquisition of an appetitive feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^-). The figures show the percentage of conditioned proboscis extension responses (PER %) to the odorants during odor-sucrose trials and in a retention test. (A) Learning and retention of a feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^- ; A : solid line and black bar; AB : dashed line and grey bar) of a group of bees ($n = 42$) injected with PBS in the lobes of the mushroom bodies. (B) Same as in (A) but after injection of PTX ($n = 42$). ** $p < 0.01$.

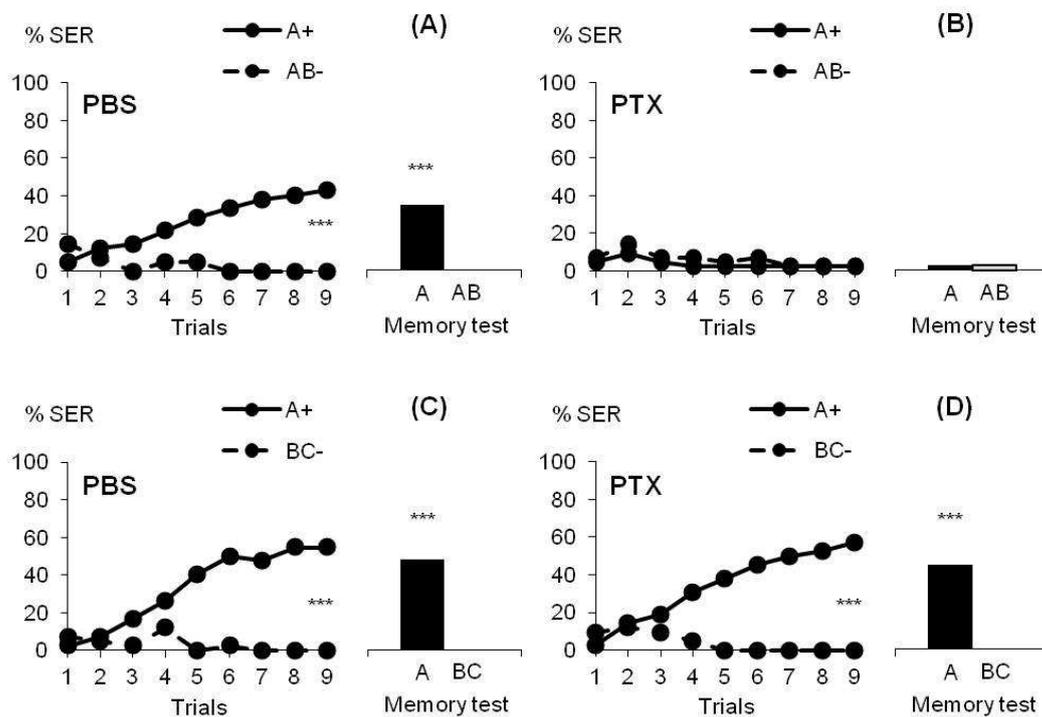


FIGURE 3 – Blockade of ionotropic GABA receptors in the calyces of the mushroom bodies impairs the acquisition of an aversive feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^-) but not of an elemental discrimination (A^+ vs. BC^-). The figures show the percentage of conditioned sting extension responses (SER %) to the odorants during odor-shock trials and in a retention test. (A) Learning and retention of a feature-negative discrimination (A^+ vs. AB^- ; A : solid line and black bar; AB : dashed line and grey bar) of a group of bees ($n = 42$) injected with PBS in the calyces of the mushroom bodies. (B) Same as in (A) but after injection of picrotoxin (PTX; $n = 42$). (C) Learning and retention of an elemental discrimination (A^+ vs. BC^- ; A : solid line and black bar; BC : dashed line and grey bar) of a group of bees ($n = 42$) injected with PBS in the calyces of the mushroom bodies. (D) Same as in (C) but after injection of PTX ($n = 42$). *** $p < 0.001$.

Bibliography

- [1] Jenkins, A. M. & Sainsbury, R. S. Discrimination learning with the distinctive feature on positive or negative trials. In Mostofsky, D. (ed.) *Attention : Contemporary Theory and Analysis* (Appleton-Century-Crofts, New York, 1970).
- [2] Jenkins, A. M. & Sainsbury, R. S. The development of stimulus control through differential reinforcement. In Mackintosh, N. J. & Honig, W. K. (eds.) *Fundamental Issues In Associative Learning* (Dalhousie University Press, Halifax, Nova Scotia, Canada, 1969).
- [3] Rescorla, R. A. Conditioned inhibition and facilitation. In *Information Processing in Animals : Conditioned Inhibition*, 299–326 (Erlbaum, Hillsdale, NJ, 1985).
- [4] Rescorla, R. A. & Wagner, A. R. A theory of Pavlovian conditioning : Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In Black, A. H. & Prokasy, W. F. (eds.) *Classical conditioning II : Current research and theory* (New-York, 1972).
- [5] Holland, P. C. The nature of conditioned inhibition in serial and simultaneous feature negative discriminations. In Miller, R. R. & Spear, N. S. (eds.) *Information processing in animals : Conditioned inhibition*, 267–297 (Eribaum, Hillsdale, NJ, 1985).

- [6] Diamond, I. T., Goldberg, J. M. & Neff, W. D. Tonal discrimination after ablation of auditory cortex. *Journal of Neurophysiology* **25**, 223–235 (1962).
- [7] Crowell, C. R. & Bernhardt, T. P. The feature-positive effect and sign-tracking behavior during discrimination learning in the rat. *Animal Learning & Behavior* **7**, 313–317 (1979).
- [8] Reberg, D. & Memmott, J. Shock as a signal for shock or no-shock : a feature-negative effect in conditioned suppression. *Journal of the experimental analysis of behavior* **32**, 387–397 (1979).
- [9] Newman, J., Wolff, W. T. & Hearst, E. The feature-positive effect in adult human subjects. *Journal of experimental psychology. Human learning and memory* **6**, 630–650 (1980).
- [10] Pace, G. M., McCoy, D. F. & Nallan, G. B. Feature-positive and feature-negative learning in the rhesus monkey and pigeon. *The American journal of psychology* **93**, 409–427 (1980).
- [11] McCoy, D. F. & Yanko, D. M. Feature-positive and feature-negative discrimination learning maintained by negative reinforcement in rhesus monkeys. *Animal Learning & Behavior* **11**, 460–464 (1983).
- [12] Menzel, R. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **185**, 323–340 (1999).
- [13] Giurfa, M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee : a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology*

- A* **193**, 801–824 (2007).
- [14] Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A. & Schäfer, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology* **97**, 107–119 (1983).
- [15] Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Invertebrate learning and memory : Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory* **19**, 54–66 (2012).
- [16] Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Aversive learning in Honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* **2**, e288 (2007).
- [17] Giurfa, M. *et al.* Olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees : Memory dependence on trial number, interstimulus interval, intertrial interval, and protein synthesis. *Learning & Memory* **16**, 761–765 (2009).
- [18] Tedjakumala, S. R. & Giurfa, M. Rules and mechanisms of punishment learning in honey bees : the aversive conditioning of the sting extension response. *Journal of Experimental Biology* **216**, 2985–2997 (2013).
- [19] Menzel, R. The insect mushroom body, an experience-dependent recoding device. *Journal of physiology, Paris* **108**, 84–95 (2014).
- [20] Komischke, B., Sandoz, J.-C., Malun, D. & Giurfa, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *European Journal of Neuroscience* **21**, 477–485 (2005).

- [21] Devaud, J.-M., Blunk, A., Podufall, J., Giurfa, M. & Grünewald, B. Using local anaesthetics to block neuronal activity and map specific learning tasks to the mushroom bodies of an insect brain. *European Journal of Neuroscience* **26**, 3193–3206 (2007).
- [22] Bicker, G., Schäfer, S. & Kingan, T. G. Mushroom body feedback interneurons in the honeybee show GABA-like immunoreactivity. *Brain Research* **360**, 394–397 (1985).
- [23] Gronenberg, W. Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *Experimental biology* **46**, 115–125 (1987).
- [24] Grünewald, B. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Comparative Neurology* **404**, 114–126 (1999).
- [25] Grünewald, B. Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* **185**, 565–576 (1999).
- [26] Rybak, J. & Menzel, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain : the neuronal connections of the alpha-lobe. *The Journal of Comparative Neurology* **334**, 444–465 (1993).
- [27] Ganeshina, O. & Menzel, R. GABA-immunoreactive neurons in the mushroom bodies of the honeybee : an electron microscopic study. *The Journal*

- of Comparative Neurology* **437**, 335–349 (2001).
- [28] Abramson, C. I. *et al.* Feature-positive and feature-negative learning in honey bees. *The Journal of experimental biology* **216**, 224–229 (2013).
- [29] Chandra, S. & Smith, B. H. An analysis of synthetic processing of odor mixtures in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **201**, 3113–3121 (1998).
- [30] Pearce, J. M. Similarity and discrimination : a selective review and a connectionist model. *Psychological Review* **101**, 587–607 (1994).
- [31] Pearce, J. M. A model for stimulus generalization in Pavlovian conditioning. *Psychological Review* **94**, 61–73 (1987).
- [32] Giurfa, M. Cognitive neuroethology : dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current Opinion in Neurobiology* **13**, 726–735 (2003).
- [33] Bouton, M. E. & Nelson, J. B. Mechanisms of feature-positive and feature-negative discrimination learning in an appetitive conditioning paradigm. In Schmajuk, N. & Holland, P. C. (eds.) *Occasion Setting : Associative Learning and Cognition in Animals*, 69–112 (American Psychological Association, Washington, D.C, 1998).
- [34] Hussaini, S. A. & Menzel, R. Mushroom body extrinsic neurons in the honeybee brain encode cues and contexts differently. *Journal of Neuroscience* **33**, 7154–7164 (2013).
- [35] Rudy, J. W. & Sutherland, R. J. The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behavioural*

- Brain Research* **34**, 97–109 (1989).
- [36] Sutherland, R. J. & Rudy, J. W. Configural association theory : The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology* **17**, 129–144 (1989).
- [37] Schubert, M., Lachnit, H., Francucci, S. & Giurfa, M. Nonelemental visual learning in honeybees. *Animal Behaviour* **64**, 175–184 (2002).
- [38] Giurfa, M., Schubert, M., Reisenman, C., Gerber, B. & Lachnit, H. The effect of cumulative experience on the use of elemental and configural visual discrimination strategies in honeybees. *Behavioural Brain Research* **145**, 161–169 (2003).
- [39] Deisig, N., Lachnit, H., Giurfa, M. & Hellstern, F. Configural olfactory learning in honeybees : negative and positive patterning discrimination. *Learning & Memory* **8**, 70–78 (2001).
- [40] Deisig, N., Lachnit, H. & Giurfa, M. The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learning & Memory* **9**, 112–121 (2002).
- [41] Deisig, N., Lachnit, H., Sandoz, J.-C., Lober, K. & Giurfa, M. A modified version of the unique cue theory accounts for olfactory compound processing in honeybees. *Learning & Memory* **10**, 199–208 (2003).
- [42] Komischke, B., Sandoz, J.-C., Lachnit, H. & Giurfa, M. Non-elemental processing in olfactory discrimination tasks needs bilateral input in honeybees. *Behavioural Brain Research* **145**, 135–143 (2003).

- [43] Young, J. M., Wessnitzer, J., Armstrong, J. D. & Webb, B. Elemental and non-elemental olfactory learning in *Drosophila*. *Neurobiology of Learning and Memory* **96**, 339–352 (2011).
- [44] Sommerlandt, F. M. J., Rössler, W. & Spaethe, J. Elemental and non-elemental olfactory learning using PER conditioning in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Apidologie* **45**, 106–115 (2014).
- [45] Devaud, J.-M., Papouin, T., Grünewald, B. & Giurfa, M. A neural substrate for higher-order learning in an insect : configural tasks require mushroom body function. . *submitted* .
- [46] Lachnit, H., Giurfa, M. & Menzel, R. Odor processing in honeybees : is the whole equal to, more than, or different from the sum of its parts ? In Slater, P. *et al.* (eds.) *Advances in the study of behavior*, 241–264 (Advances in the Study of Behavior, 2004).
- [47] Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H. & Sandoz, J.-C. Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *European Journal of Neuroscience* **24**, 1161–1174 (2006).
- [48] Deisig, N., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Antennal lobe processing increases separability of odor mixture representations in the honeybee. *Journal of Neurophysiology* **103**, 2185–2194 (2010).
- [49] Boitard, C., Devaud, J.-M., Isabel, G. & Giurfa, M. GABAergic feedback signaling into the calyces of the mushroom bodies enables olfactory rever-

- sal learning in honey bees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **9**, 1–13 (2015).
- [50] Farris, S. M. Are mushroom bodies cerebellum-like structures? *Arthropod structure & development* **40**, 368–379 (2011).
- [51] Avarguès-Weber, A. & Giurfa, M. Conceptual learning by miniature brains. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **280**, 20131907 (2013).
- [52] Miller, S. M., Ngo, T. T. & van Swinderen, B. Attentional switching in humans and flies : rivalry in large and miniature brains. *Frontiers in human neuroscience* **5**, 188 (2011).
- [53] van Swinderen, B. & Andretic, R. Dopamine in Drosophila : setting arousal thresholds in a miniature brain. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* **278**, 906–913 (2011).
- [54] Mota, T., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Color modulates olfactory learning in honeybees by an occasion-setting mechanism. *Learning & Memory* **18**, 144–155 (2011).
- [55] Okada, R., Rybak, J., Manz, G. & Menzel, R. Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the Honeybee brain. *Journal of Neuroscience* **27**, 11736–11747 (2007).
- [56] Malun, D. *et al.* Hydroxyurea-induced partial mushroom body ablation does not affect acquisition and retention of olfactory differential conditioning in honeybees. *Journal of Neurobiology* **53**, 343–360 (2002).

- [57] Menzel, R. Massed and spaced learning in Honeybees : The role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learning & Memory* **8**, 198–208 (2001).
- [58] Hammer, M. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* **366**, 59–63 (1993).
- [59] Hammer, M. The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends in Neurosciences* **20**, 245–252 (1997).
- [60] Faber, T., Joerges, J. & Menzel, R. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience* **2**, 74–78 (1999).
- [61] Hourcade, B., Perisse, E., Devaud, J.-M. & Sandoz, J.-C. Long-term memory shapes the primary olfactory center of an insect brain. *Learning & Memory* **16**, 607–615 (2009).
- [62] Hammer, M. & Menzel, R. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & Memory* **5**, 146–156 (1998).
- [63] Heisenberg, M. Mushroom body memoir : from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 266–275 (2003).
- [64] Gerber, B., Tanimoto, H. & Heisenberg, M. An engram found ? Evaluating the evidence from fruit flies. *Current Opinion in Neurobiology* **14**, 737–744 (2004).

- [65] Krashes, M. J., Keene, A. C., Leung, B., Armstrong, J. D. & Waddell, S. Sequential use of mushroom body neuron subsets during drosophila odor memory processing. *Neuron* **53**, 103–115 (2007).
- [66] Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees : a step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods* **211**, 159–167 (2012).
- [67] Carcaud, J., Roussel, E., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Odour aversion after olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees. *Journal of Experimental Biology* **212**, 620–626 (2009).
- [68] Froese, A., Szyszka, P. & Menzel, R. Effect of GABAergic inhibition on odorant concentration coding in mushroom body intrinsic neurons of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **200**, 183–195 (2014).
- [69] Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H. & Laurent, G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* **390**, 70–74 (1997).
- [70] MacLeod, K. & Laurent, G. Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* **274**, 976–979 (1996).
- [71] Mwilaria, E. K., Ghatak, C. & Daly, K. C. Disruption of GABA_A in the Insect Antennal Lobe Generally Increases Odor Detection and Discrimination Thresholds. *Chemical Senses* **33**, 267–281 (2008).

- [72] Wilson, R. I. & Laurent, G. Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the *Drosophila* antennal lobe. *Journal of Neuroscience* **25**, 9069–9079 (2005).
- [73] Lunney, G. H. Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable : an empirical study. *Journal of educational measurement* **7**, 263–269 (1970).

Bibliographie

- [1] Takeda, K. Classical conditioned response in the honey bee. *Journal of Insect Physiology* **6**, 168–179 (1960).
- [2] Bitterman, M. E., Menzel, R., Fietz, A. & Schäfer, S. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Comparative Psychology* **97**, 107–119 (1983).
- [3] Wilson, E. O. *The insect societies*. (Harvard University Press, 1971).
- [4] Winston, M. L. *The biology of the Honey Bee*. (Harvard University Press, 1991).
- [5] Giurfa, M. Cognition with few neurons : higher-order learning in insects. *Trends in Neurosciences* **36**, 285–294 (2013).
- [6] Guerrieri, F., Schubert, M., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Perceptual and neural olfactory similarity in Honeybees. *PLoS Biology* **3**, 718–732 (2005).
- [7] Getz, W. M. & Smith, K. B. Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* **160**, 239–245 (1987).

- [8] Chittka, L., Thomson, J. D. & Waser, N. M. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* **86**, 361–377 (1999).
- [9] Vergoz, V., Roussel, E., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Aversive learning in Honeybees revealed by the olfactory conditioning of the sting extension reflex. *PLoS ONE* **2**, e288 (2007).
- [10] Tedjakumala, S. R. & Giurfa, M. Rules and mechanisms of punishment learning in honey bees : the aversive conditioning of the sting extension response. *Journal of Experimental Biology* **216**, 2985–2997 (2013).
- [11] Mobbs, P. G. Neural networks in the mushroom bodies of the honeybee. *Journal of Insect Physiology* **30**, 43–58 (1983).
- [12] Matsumoto, Y., Menzel, R., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Revisiting olfactory classical conditioning of the proboscis extension response in honey bees : a step toward standardized procedures. *Journal of Neuroscience Methods* **211**, 159–167 (2012).
- [13] Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Invertebrate learning and memory : Fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. *Learning & Memory* **19**, 54–66 (2012).
- [14] Menzel, R. Massed and spaced learning in Honeybees : The role of CS, US, the intertrial interval, and the test interval. *Learning & Memory* **8**, 198–208 (2001).

- [15] Giurfa, M. *et al.* Olfactory conditioning of the sting extension reflex in honeybees : Memory dependence on trial number, interstimulus interval, intertrial interval, and protein synthesis. *Learning & Memory* **16**, 761–765 (2009).
- [16] Menzel, R. The honeybee as a model for understanding the basis of cognition. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 758–768 (2012).
- [17] Müller, U. Learning in honeybees : from molecules to behaviour. *Zoology* **105**, 313–320 (2002).
- [18] Hourcade, B., Muenz, T. S., Sandoz, J.-C., Rossler, W. & Devaud, J.-M. Long-term memory leads to synaptic reorganization in the mushroom bodies : A memory trace in the insect brain? *Journal of Neuroscience* **30**, 6461–6465 (2010).
- [19] Rescorla, R. A. & Wagner, A. R. *Classical conditioning II : Current research and theory* (New York : Appleton-Century Crofts, 1972).
- [20] Rescorla, R. A. & Wagner, A. R. A theory of Pavlovian conditioning : Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. In Black, A. H. & Prokasy, W. F. (eds.) *Classical conditioning II : Current research and theory* (New-York, 1972).
- [21] Giurfa, M. Cognitive neuroethology : dissecting non-elemental learning in a honeybee brain. *Current Opinion in Neurobiology* **13**, 726–735 (2003).
- [22] Komischke, B., Sandoz, J.-C., Lachnit, H. & Giurfa, M. Non-elemental processing in olfactory discrimination tasks needs bilateral input in ho-

- neybees. *Behavioural Brain Research* **145**, 135–143 (2003).
- [23] Deisig, N., Lachnit, H., Giurfa, M. & Hellstern, F. Configural olfactory learning in honeybees : negative and positive patterning discrimination. *Learning & Memory* **8**, 70–78 (2001).
- [24] Deisig, N., Giurfa, M., Lachnit, H. & Sandoz, J.-C. Neural representation of olfactory mixtures in the honeybee antennal lobe. *European Journal of Neuroscience* **24**, 1161–1174 (2006).
- [25] Deisig, N., Lachnit, H. & Giurfa, M. The effect of similarity between elemental stimuli and compounds in olfactory patterning discriminations. *Learning & Memory* **9**, 112–121 (2002).
- [26] Chandra, S. & Smith, B. H. An analysis of synthetic processing of odor mixtures in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **201**, 3113–3121 (1998).
- [27] Pearce, J. M. Similarity and discrimination : a selective review and a connectionist model. *Psychological Review* **101**, 587–607 (1994).
- [28] Driscoll, I., Howard, S. R., Prusky, G. T., Rudy, J. W. & Sutherland, R. J. Seahorse wins all races : Hippocampus participates in both linear and non-linear visual discrimination learning. *Behavioural Brain Research* **164**, 29–35 (2005).
- [29] Young, J. M., Wessnitzer, J., Armstrong, J. D. & Webb, B. Elemental and non-elemental olfactory learning in *Drosophila*. *Neurobiology of Learning and Memory* **96**, 339–352 (2011).

- [30] Waddell, S. & Quinn, W. G. What can we teach *Drosophila*? What can they teach us? *Trends in Genetics* **17**, 719–726 (2001).
- [31] Krashes, M. J. *et al.* A neural circuit mechanism integrating motivational state with memory expression in *Drosophila*. *Cell* **139**, 416–427 (2009).
- [32] Busto, G. U., Cervantes-Sandoval, I. & Davis, R. L. Olfactory learning in *Drosophila*. *Physiology* **25**, 338–346 (2010).
- [33] Tully, T. & Quinn, W. G. Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A* **157**, 263–277 (1985).
- [34] Tempel, B. L., Bonini, N., Dawson, D. R. & Quinn, W. G. Reward learning in normal and mutant *Drosophila*. *PNAS* **80**, 1482–1486 (1983).
- [35] Couvillon, P. A. & Bitterman, M. E. Compound-component and conditional discrimination of colors and odors by honeybees : Further tests of a continuity model. *Animal Learning & Behavior* **16**, 67–74 (1988).
- [36] Giurfa, M. Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee : a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A* **193**, 801–824 (2007).
- [37] Matsumoto, Y. & Mizunami, M. Context-dependent olfactory learning in an insect. *Learning & Memory* **11**, 288–293 (2004).
- [38] Yarali, A., Mayerle, M., Nawroth, C. & Gerber, B. No evidence for visual context-dependency of olfactory learning in *Drosophila*. *Naturwissenschaften* **95**, 767–774 (2008).

- [39] Ito, K. *et al.* A systematic nomenclature for the insect brain. *Neuron* **81**, 755–765 (2014).
- [40] Rybak, J. *et al.* The Digital Bee Brain : integrating and managing neurons in a common 3D reference system. *Frontiers in Systems Neuroscience* **4** (2010).
- [41] Carcaud, J., Hill, T., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Differential coding by two olfactory subsystems in the honeybee brain. *Journal of Neurophysiology* **108**, 1106–1121 (2012).
- [42] Schäfer, S. & Bicker, G. Distribution of GABA-like immunoreactivity in the brain of the honeybee. *The Journal of Comparative Neurology* **246**, 287–300 (1986).
- [43] Ganeshina, O. & Menzel, R. GABA-immunoreactive neurons in the mushroom bodies of the honeybee : an electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology* **437**, 335–349 (2001).
- [44] Bicker, G. Histochemistry of classical neurotransmitters in antennal lobes and mushroom bodies of the honeybee. *Microscopy Research and Technique* **45**, 174–183 (1999).
- [45] Roussel, E., Carcaud, J., Combe, M., Giurfa, M. & Sandoz, J.-C. Olfactory coding in the honeybee lateral horn. *Current biology* **24**, 561–567 (2014).
- [46] Malun, D. *et al.* Hydroxyurea-induced partial mushroom body ablation does not affect acquisition and retention of olfactory differential condi-

- tioning in honeybees. *Journal of Neurobiology* **53**, 343–360 (2002).
- [47] Komischke, B., Sandoz, J.-C., Malun, D. & Giurfa, M. Partial unilateral lesions of the mushroom bodies affect olfactory learning in honeybees *Apis mellifera* L. *European Journal of Neuroscience* **21**, 477–485 (2005).
- [48] Devaud, J.-M., Blunk, A., Podufall, J., Giurfa, M. & Grünewald, B. Using local anaesthetics to block neuronal activity and map specific learning tasks to the mushroom bodies of an insect brain. *European Journal of Neuroscience* **26**, 3193–3206 (2007).
- [49] Strausfeld, N. J. Organization of the honey bee mushroom body : Representation of the calyx within the vertical and gamma lobes. *The Journal of Comparative Neurology* **450**, 4–33 (2002).
- [50] Rybak, J. & Menzel, R. Anatomy of the mushroom bodies in the honey bee brain : the neuronal connections of the alpha-lobe. *The Journal of Comparative Neurology* **334**, 444–465 (1993).
- [51] Mauelshagen, J. Neural correlates of olfactory learning paradigms in an identified neuron in the honeybee brain. *Journal of Neurophysiology* **69**, 609–625 (1993).
- [52] Okada, R., Rybak, J., Manz, G. & Menzel, R. Learning-related plasticity in PE1 and other mushroom body-extrinsic neurons in the Honeybee brain. *Journal of Neuroscience* **27**, 11736–11747 (2007).
- [53] Grünewald, B. Morphology of feedback neurons in the mushroom body of the honeybee, *Apis mellifera*. *The Journal of Comparative Neurology*

- 404, 114–126 (1999).
- [54] Gauthier, M. *et al.* Involvement of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in long-term memory formation in the honeybee (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* **86**, 164–174 (2006).
- [55] Grünewald, B., Wersing, A. & Wüstenberg, D. G. Learning channels. Cellular physiology of odor processing neurons within the honeybee brain. *Acta biologica Hungarica* **55**, 53–63 (2004).
- [56] Hammer, M. & Menzel, R. Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learning & Memory* **5**, 146–156 (1998).
- [57] Hammer, M. An identified neuron mediates the unconditioned stimulus in associative olfactory learning in honeybees. *Nature* **366**, 59–63 (1993).
- [58] Burke, C. J. *et al.* Layered reward signalling through octopamine and dopamine in *Drosophila*. *Nature* **492**, 433–437 (2012).
- [59] Leitch, B. & Laurent, G. GABAergic synapses in the antennal lobe and mushroom body of the locust olfactory system. *The Journal of Comparative Neurology* **372**, 487–514 (1996).
- [60] Tanaka, N. K., Tanimoto, H. & Ito, K. Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *The Journal of Comparative Neurology* **508**, 711–755 (2008).
- [61] Ren, Q., Li, H., Wu, Y., Ren, J. & Guo, A. A GABAergic inhibitory neural circuit regulates visual reversal learning in *Drosophila*. *Journal of*

- Neuroscience* **32**, 11524–11538 (2012).
- [62] Bicker, G., Schäfer, S. & Kingan, T. G. Mushroom body feedback interneurons in the honeybee show GABA-like immunoreactivity. *Brain Research* **360**, 394–397 (1985).
- [63] Gronenberg, W. Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *Experimental biology* **46**, 115–125 (1987).
- [64] Grünewald, B. Physiological properties and response modulations of mushroom body feedback neurons during olfactory learning in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* **185**, 565–576 (1999).
- [65] Brotz, T. M., Bochenek, B., Aronstein, K., French Constant, R. H. & Borst, A. gamma-Aminobutyric acid receptor distribution in the mushroom bodies of a fly (*Calliphora erythrocephala*) : a functional subdivision of Kenyon cells? *The Journal of Comparative Neurology* **383**, 42–48 (1997).
- [66] Perez-Orive, J. *et al.* Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* **297**, 359–365 (2002).
- [67] Nishino, H. & Mizunami, M. Giant input neurons of the mushroom body : intracellular recording and staining in the cockroach. *Neuroscience Letters* **246**, 57–60 (1998).

- [68] Laurent, G. & Naraghi, M. Odorant-induced oscillations in the mushroom bodies of the locust. *Journal of Neuroscience* **14**, 2993–3004 (1994).
- [69] Harrison, J. B. *et al.* Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research* **284**, 269–278 (1996).
- [70] Lin, A. C., Bygrave, A. M., de Calignon, A., Lee, T. & Miesenböck, G. Sparse, decorrelated odor coding in the mushroom body enhances learned odor discrimination. *Nature Neuroscience* **17**, 559–568 (2014).
- [71] Sattelle, D. B., Lummis, S. C., Wong, J. F. & Rauh, J. J. Pharmacology of insect GABA receptors. *Neurochemical Research* **16**, 363–374 (1991).
- [72] Barbara, G. S., Zube, C., Rybak, J., Gauthier, M. & Grünewald, B. Acetylcholine, GABA and glutamate induce ionic currents in cultured antennal lobe neurons of the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Physiology A* **191**, 823–836 (2005).
- [73] Hosie, A. M., Aronstein, K., Sattelle, D. B. & French Constant, R. H. Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends in Neurosciences* **20**, 578–583 (1997).
- [74] Buckingham, S. D. Insect GABA Receptors : splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Molecular Pharmacology* **68**, 942–951 (2005).

- [75] French Constant, R. H. & Rocheleau, T. A. Drosophila γ -Aminobutyric acid receptor gene *rdl* shows extensive alternative splicing. *Journal of Neurochemistry* **60**, 2323–2326 (1993).
- [76] Blankenburg, S. *et al.* Cockroach GABA_B receptor subtypes : Molecular characterization, pharmacological properties and tissue distribution. *Neuropharmacology* **88**, 134–144 (2015).
- [77] Enell, L., Hamasaka, Y., Kolodziejczyk, A. & Nässel, D. R. γ -Aminobutyric acid (GABA) signaling components in Drosophila : Immunocytochemical localization of GABA Receptors in relation to the GABA Receptor subunit RDL and a vesicular GABA transporter. *The Journal of Comparative Neurology* **505**, 18–31 (2007).
- [78] Wilson, R. I. & Laurent, G. Role of GABAergic inhibition in shaping odor-evoked spatiotemporal patterns in the Drosophila antennal lobe. *Journal of Neuroscience* **25**, 9069–9079 (2005).
- [79] Froese, A. *Olfactory processing in honeybee Kenyon cells and the involvement of the GABAergic system.* Ph.D. thesis (2009).
- [80] Froese, A., Szyszka, P. & Menzel, R. Effect of GABAergic inhibition on odorant concentration coding in mushroom body intrinsic neurons of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **200**, 183–195 (2014).
- [81] Palmer, M. J. & Harvey, J. Honeybee Kenyon cells are regulated by a tonic GABA receptor conductance. *Journal of Neurophysiology* **112**, 2026–2035 (2014).

- [82] Grünewald, B. & Wersing, A. An ionotropic GABA receptor in cultured mushroom body Kenyon cells of the honeybee and its modulation by intracellular calcium. *Journal of Comparative Physiology A* **194**, 329–340 (2008).
- [83] Dupuis, J. P. *et al.* Homomeric RDL and heteromeric RDL/LCCH3 GABA receptors in the Honeybee antennal lobes : Two candidates for inhibitory transmission in olfactory processing. *Journal of Neurophysiology* **103**, 458–468 (2010).
- [84] Choudhary, A. F., Laycock, I. & Wright, G. A. γ -Aminobutyric acid receptor A-mediated inhibition in the honeybee's antennal lobe is necessary for the formation of configural olfactory percepts. *European Journal of Neuroscience* **35**, 1718–1724 (2012).
- [85] Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B. H. & Laurent, G. Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* **390**, 70–74 (1997).
- [86] Hosler, J. S., Buxton, K. L. & Smith, B. H. Impairment of olfactory discrimination by blockade of GABA and nitric oxide activity in the honey bee antennal lobes. *Behavioral neuroscience* **114**, 514–525 (2000).
- [87] Akaike, N., Hattori, K., Oomura, Y. & Carpenter, D. O. Bicuculline and picrotoxin block gamma-aminobutyric acid-gated Cl^- conductance by different mechanisms. *Experientia* **41**, 70–71 (1985).

- [88] MacLeod, K. & Laurent, G. Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* **274**, 976–979 (1996).
- [89] Mwilaria, E. K., Ghatak, C. & Daly, K. C. Disruption of GABA_A in the Insect Antennal Lobe Generally Increases Odor Detection and Discrimination Thresholds. *Chemical Senses* **33**, 267–281 (2008).
- [90] Zar, J. H. *Biostatistical analysis*. (Prentice Hall, London, UK., 1999), 4th edn.
- [91] Matsumoto, Y. *et al.* Cyclic nucleotide-gated channels, calmodulin, adenylyl cyclase, and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II are required for late, but not early, long-term memory formation in the honeybee. *Learning & Memory* **21**, 272–286 (2014).
- [92] Boumghar, K., Couret-Fauvel, T., Garcia, M. & Armengaud, C. Evidence for a role of GABA- and glutamate-gated chloride channels in olfactory memory. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **103**, 69–75 (2012).
- [93] Murdock Jr, B. B. The serial position effect of free recall. *Journal of experimental psychology* **64**, 482–488 (1962).
- [94] Jahnke, J. C. Serial position effects in immediate serial recall. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* **2**, 284–287 (1962).
- [95] Glanzer, M. & Cunitz, A. R. Two storage mechanisms in free recall. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior* **5**, 351–360 (1965).

- [96] Roussel, E., Sandoz, J.-C. & Giurfa, M. Searching for learning-dependent changes in the antennal lobe : simultaneous recording of neural activity and aversive olfactory learning in honeybees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4** (2010).
- [97] Pamir, E. *et al.* Average group behavior does not represent individual behavior in classical conditioning of the honeybee. *Learning & Memory* **18**, 733–741 (2011).
- [98] Mota, T. & Giurfa, M. Multiple reversal olfactory learning in honeybees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4**, 74–75 (2010).
- [99] de Brito Sanchez, M. G., Serre, M., Avarguès-Weber, A., Dyer, A. G. & Giurfa, M. Learning context modulates aversive taste strength in honey bees. *The Journal of experimental biology* **218**, 949–959 (2015).
- [100] Heisenberg, M. Mushroom body memoir : from maps to models. *Nature Reviews Neuroscience* **4**, 266–275 (2003).
- [101] Davis, R. L. Olfactory memory formation in *Drosophila* : from molecular to systems neuroscience. *Neuroscience* **28**, 275–302 (2004).
- [102] Margulies, C., Tully, T. & Dubnau, J. Deconstructing memory in *Drosophila*. *Current biology* **15**, 700–713 (2005).
- [103] Tedjakumala, S. R. *Le rôle des circuits et signalisations dopaminergiques dans l'apprentissage aversif chez l'abeille *Apis mellifera**. Ph.D. thesis (2014).

- [104] Lunney, G. H. Using analysis of variance with a dichotomous dependent variable : an empirical study. *Journal of educational measurement* **7**, 263–269 (1970).
- [105] Devaud, J.-M., Papouin, T., Grünewald, B. & Giurfa, M. A neural substrate for higher-order learning in an insect : configural tasks require mushroom body function. . *PNAS* (In Press) (2015).
- [106] Hadar, R. & Menzel, R. Memory formation in reversal learning of the honeybee. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* **4**, 186–186 (2010).
- [107] Ferguson, Cobey & Smith. Sensitivity to a change in reward is heritable in the honeybee, *Apis mellifera*. *Animal Behaviour* **61**, 527–532 (2001).
- [108] Ben-Shahar, Y., Thompson, C. K., Hartz, S. M., Smith, B. H. & Robinson, G. E. Differences in performance on a reversal learning test and division of labor in honey bee colonies. *Animal Cognition* **3**, 119–125 (2000).
- [109] Komischke, B., Giurfa, M., Lachnit, H. & Malun, D. Successive olfactory reversal learning in honeybees. *Learning & Memory* **9**, 122–129 (2002).
- [110] Wu, Y., Ren, Q., Li, H. & Guo, A. The GABAergic anterior paired lateral neurons facilitate olfactory reversal learning in *Drosophila*. *Learning & Memory* **19**, 478–486 (2012).
- [111] Müller, D., Staffelt, D., Fiala, A. & Menzel, R. Procaine impairs learning and memory consolidation in the honeybee. *Brain Research* **977**, 124–127 (2003).

- [112] Lozano, V. C., Armengaud, C. & Gauthier, M. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **187**, 249–254 (2001).
- [113] Abramson, C. I. *et al.* Feature-positive and feature-negative learning in honey bees. *The Journal of experimental biology* **216**, 224–229 (2013).
- [114] Bouton, M. E. & Nelson, J. B. Mechanisms of feature-positive and feature-negative discrimination learning in an appetitive conditioning paradigm. In Schmajuk, N. & Holland, P. C. (eds.) *Occasion Setting : Associative Learning and Cognition in Animals*, 69–112 (American Psychological Association, Washington, D.C, 1998).
- [115] Jenkins, A. M. & Sainsbury, R. S. Discrimination learning with the distinctive feature on positive or negative trials. In Mostofsky, D. (ed.) *Attention : Contemporary Theory and Analysis* (Appleton-Century-Crofts, New York, 1970).
- [116] Holland, P. C. Differential effects of reinforcement of an inhibitory feature after serial and simultaneous feature negative discrimination training. *Journal of experimental psychology* **10**, 461–475 (1984).
- [117] Sutherland, R. J. & Rudy, J. W. Configural association theory : The role of the hippocampal formation in learning, memory, and amnesia. *Psychobiology* **17**, 129–144 (1989).

- [118] Rudy, J. W. & Sutherland, R. J. The hippocampal formation is necessary for rats to learn and remember configural discriminations. *Behavioural Brain Research* **34**, 97–109 (1989).
- [119] Menzel, R. Memory dynamics in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **185**, 323–340 (1999).
- [120] Menzel, R. The insect mushroom body, an experience-dependent recording device. *Journal of physiology, Paris* **108**, 84–95 (2014).
- [121] Joerges, J., Küttner, A., Galizia, C. G. & Menzel, R. Representations of odours and odour mixtures visualized in the honeybee brain. *Nature* **387**, 285–288 (1997).
- [122] Rescorla, R. A. Evidence for "unique stimulus" account of configural conditioning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **85**, 331–338 (1973).
- [123] Faber, T., Joerges, J. & Menzel, R. Associative learning modifies neural representations of odors in the insect brain. *Nature Neuroscience* **2**, 74–78 (1999).
- [124] Bateson, M., Desire, S., Gartside, S. E. & Wright, G. A. Agitated honeybees exhibit pessimistic cognitive biases. *Current biology* **21**, 1070–1073 (2011).
- [125] Avarguès-Weber, A. & Giurfa, M. Conceptual learning by miniature brains. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **280**, 20131907 (2013).

- [126] Menzel, R. & Giurfa, M. Cognitive architecture of a mini-brain : the honeybee. *Trends in cognitive sciences* **5**, 62–71 (2001).
- [127] Avarguès-Weber, A., Dyer, A. G., Combe, M. & Giurfa, M. Simultaneous mastering of two abstract concepts by the miniature brain of bees. *PNAS* **109**, 7481–7486 (2012).
- [128] Dacke, M. & Srinivasan, M. V. Evidence for counting in insects. *Animal Cognition* **11**, 683–689 (2008).
- [129] Thum, A. S., Jenett, A., Ito, K., Heisenberg, M. & Tanimoto, H. Multiple memory traces for olfactory reward learning in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **27**, 11132–11138 (2007).
- [130] Honegger, K. S., Campbell, R. A. A. & Turner, G. C. Cellular-resolution population imaging reveals robust sparse coding in the *Drosophila* mushroom body. *Journal of Neuroscience* **31**, 11772–11785 (2011).
- [131] Papadopoulou, M., Cassenaer, S., Nowotny, T. & Laurent, G. Normalization for sparse encoding of odors by a wide-field interneuron. *Science* **332**, 721–725 (2011).
- [132] Liu, X. & Davis, R. L. The GABAergic anterior paired lateral neuron suppresses and is suppressed by olfactory learning. *Nature Neuroscience* **12**, 53–59 (2009).
- [133] Hammer, M. The neural basis of associative reward learning in honeybees. *Trends in Neurosciences* **20**, 245–252 (1997).

- [134] Zhang, H. G., Lee, H. J., Rocheleau, T. A., French Constant, R. H. & Jackson, M. B. Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptors. *Molecular Pharmacology* **48**, 835–840 (1995).
- [135] Laurent, G. & Davidowitz, H. Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science* **265**, 1872–1875 (2008).
- [136] Laurent, G., Wehr, M. & Davidowitz, H. Temporal representations of odors in an olfactory network. *Journal of Neuroscience* **16**, 3837–3847 (1996).
- [137] Séjourné, J. *et al.* Mushroom body efferent neurons responsible for aversive olfactory memory retrieval in *Drosophila*. *Nature Neuroscience* **14**, 903–910 (2011).
- [138] Abramson, C. I. Aversive conditioning in Honeybees. *Journal of Comparative Psychology* **100**, 1–9 (1986).
- [139] Pritchatt, D. Further studies on the avoidance behaviour of *Periplaneta americana* to electric shock. *Animal Behaviour* **18**, 485–492 (1970).
- [140] Peckmezian, T. & Taylor, P. W. Electric shock for aversion training of jumping spiders : Towards an arachnid model of avoidance learning. *Behavioural Processes* **113**, 99–104 (2015).
- [141] Maren, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Neuroscience* **24**, 897–931 (2000).

- [142] Hussaini, S. A., Bogusch, L., Landgraf, T. & Menzel, R. Sleep deprivation affects extinction but not acquisition memory in honeybees. *Learning & Memory* **16**, 698–705 (2009).
- [143] Vinauger, C., Lallement, H. & Lazzari, C. R. Learning and memory in *Rhodnius prolixus* : habituation and aversive operant conditioning of the proboscis extension response. *Journal of Experimental Biology* **216**, 892–900 (2013).
- [144] Yang, Z., Bertolucci, F., Wolf, R. & Heisenberg, M. Flies cope with uncontrollable stress by learned helplessness. *Current biology* **23**, 799–803 (2013).
- [145] Deisig, N., Sandoz, J.-C., Giurfa, M. & Lachnit, H. The trial-spacing effect in olfactory patterning discriminations in honeybees. *Behavioural Brain Research* **176**, 314–322 (2007).
- [146] Giurfa, M., Schubert, M., Reisenman, C., Gerber, B. & Lachnit, H. The effect of cumulative experience on the use of elemental and configural visual discrimination strategies in honeybees. *Behavioural Brain Research* **145**, 161–169 (2003).
- [147] Chambers, M. S. *et al.* Identification of a novel, selective GABA A α 5 receptor inverse agonist which enhances cognition. *Journal of Medicinal Chemistry* **46**, 2227–2240 (2003).
- [148] Atack, J. R. *et al.* L-655,708 enhances cognition in rats but is not pro-convulsant at a dose selective for alpha5-containing GABA_A receptors.

- Neuropharmacology* **51**, 1023–1029 (2006).
- [149] Navarro, J. F., Burón, E. & Martín-López, M. Anxiogenic-like activity of L-655,708, a selective ligand for the benzodiazepine site of GABA_(A) receptors which contain the alpha-5 subunit, in the elevated plus-maze test. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **26**, 1389–1392 (2002).
- [150] Saab, B. J. *et al.* Short-term memory impairment after isoflurane in mice is prevented by the $\alpha 5$ γ -aminobutyric acid type A receptor inverse agonist L-655,708. *Anesthesiology* **113**, 1061–1071 (2010).
- [151] Ueno, S., Bracamontes, J., Zorumski, C., Weiss, D. S. & Steinbach, J. H. Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABA_A receptor. *Journal of Neuroscience* **17**, 625–634 (1997).
- [152] Yeung, J. Y. T. *et al.* Tonicly activated GABA_A receptors in hippocampal neurons are high-affinity, low-conductance sensors for extracellular GABA. *Molecular Pharmacology* **63**, 2–8 (2003).
- [153] Hannon, G. J. RNA interference. *Nature* **418**, 244–251 (2002).
- [154] Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature biotechnology* **18**, 896–898 (2000).
- [155] Honeybee Genome Sequencing Consortium. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* **443**, 931–949 (2006).

- [156] Farooqui, T., Robinson, K., Vaessin, H. & Smith, B. H. Modulation of early olfactory processing by an octopaminergic reinforcement pathway in the honeybee. *Journal of Neuroscience* **23**, 5370–5380 (2003).
- [157] Farooqui, T., Vaessin, H. & Smith, B. H. Octopamine receptors in the honeybee (*Apis mellifera*) brain and their disruption by RNA-mediated interference. *Journal of Insect Physiology* **50**, 701–713 (2004).
- [158] El Hassani, A. K. *et al.* Identification, localization and function of glutamate-gated chloride channel receptors in the honeybee brain. *European Journal of Neuroscience* **36**, 2409–2420 (2012).
- [159] Démares, F. *Caractérisation anatomique et fonctionnelle de deux variants d'épissage des récepteurs GluCl - Rôle dans l'apprentissage et la mémoire chez l'abeille, Apis mellifera*. Ph.D. thesis (2013).
- [160] Démares, F. *et al.* Differential involvement of glutamate-gated chloride channel splice variants in the olfactory memory processes of the honeybee *Apis mellifera*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **124**, 137–144 (2014).
- [161] Müssig, L. *et al.* Acute disruption of the NMDA receptor subunit NR1 in the honeybee brain selectively impairs memory formation. *Journal of Neuroscience* **30**, 7817–7825 (2010).
- [162] Lozano, V. C., Armengaud, C. & Gauthier, M. Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies

-
- of the honeybee. *Journal of Comparative Physiology A* **187**, 249–254 (2001).
- [163] Dimitrijevic, N. *et al.* Drosophila GABA_B receptors are involved in behavioral effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *European Journal of Pharmacology* **519**, 246–252 (2005).
- [164] Dzitoyeva, S., Dimitrijevic, N. & Manev, H. Gamma-Aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in Drosophila : Adult RNA interference and pharmacological evidence. *PNAS* **100**, 5485–5490 (2003).
- [165] Rigosi, E. *et al.* Asymmetric neural coding revealed by in vivo calcium imaging in the honey bee brain. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **282**, 20142571 (2015).
- [166] Rigosi, E. *et al.* Searching for anatomical correlates of olfactory lateralization in the honeybee antennal lobes : a morphological and behavioural study. *Behavioural Brain Research* **221**, 290–294 (2011).
- [167] Frasnelli, E., Anfora, G., Trona, F. & Tassarolo, F. Morpho-functional asymmetry of the olfactory receptors of the honeybee (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research* **209**, 221–225 (2010).
- [168] Letzkus, P. *et al.* Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. *Current biology* **16**, 1471–1476 (2006).
- [169] Anfora, G., Frasnelli, E., Maccagnani, B., Rogers, L. J. & Vallortigara, G. Behavioural and electrophysiological lateralization in a social (*Apis*

- mellifera*) but not in a non-social (*Osmia cornuta*) species of bee. *Behavioural Brain Research* **206**, 236–239 (2010).
- [170] Rogers, L. J. & Vallortigara, G. From antenna to antenna : lateral shift of olfactory memory recall by honeybees. *PLoS ONE* **3**, e2340 (2008).
- [171] Girardin, C. C., Kreissl, S. & Galizia, C. G. Inhibitory connections in the honeybee antennal lobe are spatially patchy. *Journal of Neurophysiology* **109**, 332–343 (2013).
- [172] Raccuglia, D. & Mueller, U. Focal uncaging of GABA reveals a temporally defined role for GABAergic inhibition during appetitive associative olfactory conditioning in honeybees. *Learning & Memory* **20**, 410–416 (2013).
- [173] Raccuglia, D. & Mueller, U. Temporal integration of cholinergic and GABAergic inputs in isolated insect mushroom body neurons exposes pairing-specific signal processing. *Journal of Neuroscience* **34**, 16086–16092 (2014).
- [174] Haehnel, M. & Menzel, R. Sensory representation and learning-related plasticity in mushroom body extrinsic feedback neurons of the protocerebral tract. *Frontiers in Systems Neuroscience* **4** (2010).

Table des figures

1.1	Les Hyménoptères constituent un ordre d'insectes très varié. Ici, quelques espèces représentatives (de gauche à droite) : un symphyte, une guêpe, une fourmi et une abeille domestique. Modifié d'après la librairie en ligne de John R. Meyer, North Carolina State University (2009).	4
1.2	Réflexe d'extension du proboscis, inné ou conditionné par un apprentissage associatif appétitif. D'après Matsumoto et coll. (2012) [12].	9
1.3	Réflexe d'extension du dard, inné ou obtenu par un apprentis- sage associatif aversif. D'après Tedjakumala et coll. (2013) [10].	12

1.4 Les multiples phases de la formation de la mémoire chez l'abeille.
Le conditionnement du REP en un seul essai entraîne la formation de la mémoire à court et moyen terme (STM et MTM, en Anglais), tandis que des essais répétés entraîne la formation de la mémoire à long terme tardive puis précoce (e-LTM et l-LTM, respectivement). Les récepteurs cholinergiques du circuit olfactif sont activés par une odeur (CS, en Anglais), et le neurone octopaminergique VUMmx1 est activé par le sucre et entraîne l'initiation d'une signalisation représentée en bas. La transition entre la mémoire à court et moyen terme dépend de la protéine kinase C (PKC). Une voie moléculaire parallèle impliquant la PKA permet la transition en mémoire à long terme précoce (e-LTM). La phase tardive dépendante de la traduction (l-LTM) est initiée par la suite ou en parallèle à la phase précoce. D'après Menzel (2012), modifié d'après Müller (2002) [16, 17]. 14

1.5 Représentation du cerveau de l'abeille en place dans la capsule céphalique (en haut) et détaillé *ex situ* (en bas). Les différents neuropiles sont définis par convention par différentes couleurs : corps pédonculés (en rouge), lobes antennaires (en bleu) et lobes optiques (en jaune). Les composants du cerveau moyen sont fusionnés en transparence pour simplifier la représentation. La barre d'échelle représente 300 μm . Les abréviations sont en Anglais; CB : corps central; PL : lobe protocérébral; ppl : lobe protocérébral postérieur, Lo : lobula; Me : medulla, li : lèvres, co : collier, br : anneau basal, lh : corne latérale, ot : tubercule optique, lac : lobe accessoire latéral, mc : calice median, lc : calice lateral, pe : péduncule, α : lobe alpha vertical, β : lobe médian beta, SOG : ganglion sous-oesophagien. Modifié d'après Rybak et coll. (2010) [40]. 22

1.6 Représentation schématique dans le cerveau d'abeille des inner-
 vations et de la contingence des voies neuronales transmettant
 l'information olfactive du stimulus conditionnel (en bleu, hémis-
 sphère gauche) et l'information gustative du stimulus incondi-
 tionnel (en rouge, hémisphère droit) impliquées dans l'appren-
 tissage associatif appétitif. Le lobe antennaire (AL) reçoit les
 informations olfactives (en bleu), que les neurones de projection
 (PN) convoient ensuite par différents tracta jusqu'aux aires su-
 périeures : corps pédonculés (MB) et corne latérale (LH). Les
 dendrites des cellules de Kenyon forment les calices (ca) et leurs
 axones le pédoncule (Pe) et les lobes verticaux α et médians
 β . Les neurones centrifuges (CN, en mauve) exercent une mo-
 dulation rétrograde sur les lobes antennaires. Le signal gustatif
 apporté par le neurone VUMmx1 (en rouge) est envoyé au lobe
 antennaire, à la corne latérale et aux calices des CP. Modifié
 d'après Giurfa (2013) [5]. 29

1.7 Représentation schématique dans le cerveau d'abeille des inner-
vations et de la contingence des voies neuronales transmettant
l'information olfactive du stimulus conditionnel (en bleu, hémis-
sphère gauche) et l'information nociceptive du stimulus incon-
ditionnel (groupes de neurones dopaminergiques, en rose) impli-
quées dans l'apprentissage associatif aversif. Le signal nociceptif,
potentiellement traité par les neurones dopaminergiques C1–C3
(en rose) est envoyé dans les lobes α verticaux, le corps central
(CB) et les calices, où se fait la congruence avec le signal olfactif.
Modifié d'après Tedjakumala et Giurfa (2013) [10]. 32

- 1.8 A gauche, représentation schématique du circuit inhibiteur des neurones récurrents (en rouge) des corps pédonculés chez l'abeille. Leurs corps cellulaires, situé près des lobes optiques, projette ses expansions dendritiques au niveau des lobes où l'information est captée, traitée puis renvoyée au niveau de la lèvre des calices médians et latéraux, qui constitue la zone d'afférence olfactive des corps pédonculés. D'après Ganeshina et Menzel (2001) [43].
- A droite, montage de plusieurs photo-micrographies d'une préparation entière à différentes profondeurs en vue frontale d'un groupe de quatre neurones récurrents marqués au cobalt chez l'abeille. Le pédoncule et le lobe β ne sont pas visibles. α : lobe vertical α ; cb : corps cellulaires ; med, lat : calice médian et latéral ; sb : branches des neurones récurrents en dehors des lobes verticaux ; n : neurites ; PCT : tractus protocérébro-calical. Les contours du lobe vertical sont indiqués en traits pleins, et la barre d'échelle représente $100 \mu\text{m}$. D'après Gronenberg (1987) [63]. 34

1.9 Représentation schématique simplifiée de la circuiterie interne des neurones PCT au sein des corps pédonculés, entre les différentes couches du lobe vertical (en bas) et le calice. Les flèches indiquent le flux d'information, issu des cellules de Kenyon (traits en tiret) et des neurones récurrents PCT (traits pleins). Les afférences dans les calices sont réparties en fonction des sous-compartiments, la lèvre (afférences olfactives), le collier (afférences visuelles) et l'anneau basal (afférences mixtes). Dans le lobe vertical, les cellules de Kenyon font synapse avec les neurones extrinsèques efférents (non visibles). Les neurones PCT (FN1–FN4) convoient de façon récurrente l'information des lobes aux calices. En plus de l'absence de correspondance du transfert d'informations par le groupe FN2, un sous-groupe de cellules de Kenyon de la région du collier termine ventralement dans les couches du lobe vertical [50] indiquant des connections non correspondantes. Modifié d'après Grünewald (1999) [53]. 36

1.10 Molécule de GABA. D'après Sattelle et coll. (1991) [71]. 39

1.11	Schéma simplifié d'un récepteur-canal de type ionotropique (à gauche) et d'un récepteur métabotropique couplé à une protéine G à sept domaines transmembranaires (à droite). Le site de fixation du ligand est représentée par le disque rouge. EC : compartiment extra-cellulaire ; MB : membrane ; IC : compartiment intra-cellulaire. Modifié d'après Barbara (2007) [72].	40
1.12	Schéma simplifié des configurations structurales des trois superfamilles de récepteurs canaux à trois, quatre ou cinq sous-unités (en haut) et la composition des sous-unités correspondantes (en bas) à deux, trois ou quatre domaines transmembranaires, respectivement. Le site de fixation du ligand sur chaque type de récepteur est représenté par le cercle rouge. Modifié d'après Barbara (2007) [72].	41
2.1	Molécule de CGP_{54626} hydrochloride. D'après Sattelle, 1991 [71].	53
2.2	Molécule de Picrotoxine. D'après Sattelle (1991) [71].	54

2.3 Spécificité des réponses lors du dernier essai de conditionnement simple, pour les groupes injectés à la PTX (à gauche) et la CGP_{54626} (à droite) au niveau des calices des CP (PTX : n = 49, 26, 34 et 22 ; CGP_{54626} : n = 27, 26, 28 et 29). La flèche représente la gamme de concentration dans laquelle la dose efficace pour la suite des expériences a été établie. Les différences entre groupes ont été obtenues par le calcul statistique du test de Dunnett de comparaison de proportions par rapport au groupe contrôle : * $P < 0,05$ 58

2.4 Modèle de dissection de la capsule céphalique de l'abeille permettant d'accéder au cerveau et de procéder aux micro-injections pharmacologiques. Les sites d'injections dans les calices (au milieu) ou dans les lobes verticaux (en bas) en fonction de l'expérience sont représentés par des cercles rouges. 60

- 2.5 Conditionnement de la réponse d'extension du proboscis d'une abeille en contention. L'odeur constituant le stimulus conditionnel, dont la présentation est symbolisée par le rectangle rouge, est initialement neutre et n'induit pas de réponse. L'association de l'odeur et de la récompense sucrée, ou stimulus inconditionnel dont la présentation est symbolisée par le rectangle bleu, engendre l'établissement d'une mémoire associative et induit une réponse conditionnée (REP) à l'odeur seule après conditionnement. Modifié d'après Matsumoto et coll. (2012) [12]. 64
- 2.6 Séquence temporelle de conditionnement de l'inversion de consigne, montrant l'alternance des 5 présentations du stimulus conditionnel renforcé (associé au sucre, en noir) et des 5 présentations du stimulus non renforcé. Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. La séquence d'un essai est détaillée dans la partie du bas, et comprend après la familiarisation la présentation conjointe SC^+ et SI ou SC^- seul. Modifié d'après Matsumoto et coll. (2012) [12]. 67

2.7 Séquence temporelle de conditionnement appétitif du *feature* négatif, montrant l’alternance des 8 présentations de l’odeur seule renforcée (en blanc) et des 8 présentations du mélange non renforcé (en gris). Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. Modifié d’après Matsumoto et coll. (2012) [12]. 71

2.8 Séquence temporelle de conditionnement aversif de *feature* négatif, montrant l’alternance des 9 présentations de l’odeur seule (en blanc) renforcée par le choc électrique (en noir) et des 9 présentations du mélange non renforcé (en gris). Le test de rétention de mémoire consiste à présenter une heure après chaque odeur, sans renforcement. Modifié d’après Matsumoto et coll. (2012) [12]. 77

3.1 L'anesthésie des CP altère l'acquisition et le rappel de l'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 36, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Procaïne (n = 36, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. 87

-
- 3.2 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l'acquisition et le rappel de l'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 40, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 92
- 3.3 Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de l'inversion de consigne de la Figure 3.2 (page 92), entre le groupe contrôle injecté au PBS (n = 40, en noir) et celui injecté à la PTX (n = 40, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$ 94

3.4 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de deux phases de discrimination simples ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement (A / C : ligne pleine; B / D : ligne en tirets) et du test de rétention à une heure (C : barre noire; D : barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 40, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 99

3.5 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de l'extinction de mémoire ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 40, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. . 105

3.6 Le blocage des récepteurs au GABA métabotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de l'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la CGP_{54626} (n = 40, en bas) au niveau des calices. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. . 109

3.7 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de l'inversion de consigne ($A^+ B^- \rightarrow A^- B^+$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement et du test de rétention à une heure (A : ligne pleine et barre noire ; B : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 40, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.114

3.8 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel de deux phases de discrimination simples ($A^+ B^- \rightarrow C^+ D^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours des phases de conditionnement (A / C : ligne pleine; B / D : ligne en tirets) et du test de rétention à une heure (C : barre noire; D : barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 40, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 40, en bas) au niveau des lobes verticaux. La ligne verticale en pointillés indique l'étape d'injection pendant la transition entre les deux phases. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 117

-
- 4.1 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l'acquisition et le rappel du *feature* négatif appétitif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 55, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 55, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 126
- 4.2 Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif de la Figure 4.1 (page 126), entre le groupe contrôle injecté au PBS (n = 55, en noir) et celui injecté à la PTX (n = 55, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$ 127

- 4.3 L'altération de l'acquisition et du rappel du *feature* négatif appétitif ($A^+ AB^-$) par le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'est pas liée à un effet retard. La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination étendue de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire ; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 52, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 52, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 130
- 4.4 Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif étendu de la Figure 4.3 (page 130), entre le groupe contrôle injecté au PBS (n = 52, en noir) et celui injecté à la PTX (n = 52, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$ 131

-
- 4.5 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel d'une discrimination de mélange simple ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 43, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 43, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 134
- 4.6 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel du *feature* négatif appétitif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 42, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 42, en bas) au niveau des lobes verticaux. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. . 140

- 4.7 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des lobes des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel d'une discrimination de mélange simple ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du proboscis (% REP) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 42, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 42, en bas) au niveau des lobes verticaux. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. . 143
- 4.8 Les abeilles sont capables d'apprendre une tâche de *feature* négatif aversif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe d'abeilles conditionnées (n = 115). ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 148

- 4.9 Les abeilles sont aussi capables d'apprendre une discrimination de mélange simple aversive ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe d'abeilles conditionnées (n = 47). ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. 150
- 4.10 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP altère l'acquisition et le rappel du *feature* négatif aversif ($A^+ AB^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination de *feature* négatif (A^+ : ligne pleine et barre noire; AB^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 42, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 42, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 153

- 4.11 Différence dans la spécificité des réponses lors du dernier essai de *feature* négatif aversif de la Figure 4.10 (page 153), entre le groupe contrôle injecté au PBS (n = 42, en noir) et celui injecté à la PTX (n = 42, en gris) au niveau des calices des CP. La différence entre les deux groupes a été obtenue par le calcul statistique du test de Dunnett : *** $P < 0,001$ 154
- 4.12 Le blocage des récepteurs au GABA ionotropiques des calices des CP n'altère pas l'acquisition ni le rappel d'une discrimination de mélange simple aversive ($A^+ BC^-$). La figure montre le pourcentage de réponses conditionnées d'extension du dard (% RED) aux odeurs au cours du conditionnement et du test de rétention à une heure d'une discrimination simple (A^+ : ligne pleine et barre noire; BC^- : ligne en tirets et barre grise) du groupe contrôle d'abeilles injectées au PBS (n = 42, en haut) et du groupe d'abeilles injectées à la Picrotoxine (n = 42, en bas) au niveau des calices. ANOVA à mesures répétées, test post-hoc de Tukey : * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ 157

- 5.1 Proportions d'abeilles non apprenantes (en blanc) et d'abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre de l'inversion de consigne appétitive. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ B^-$ puis $C^+ D^-$, à gauche) il apparait que 85% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d'apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ B^-$ puis $A^- B^+$, à droite), 40% des abeilles sont capables d'apprendre, dont 20% par la voie élémentaire et 20% par la voie non élémentaire. Les 60% restants (ou 15% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, tous les groupes sont différents entre eux ($P < 0,001$) ; dans le cas du protocole ambigu, le dernier groupe est différent ($P < 0,001$) et tous sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$). 171

5.2 Proportions d'abeilles non apprenantes (en blanc) et d'abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre du *feature* négatif appétitif. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ BC^-$, à gauche) il apparaît que 65% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d'apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ AB^-$, à droite), 40% des abeilles sont capables d'apprendre, dont 15% par la voie élémentaire et 25% par la voie non élémentaire. Les 60% restants (ou 35% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, tous les groupes sont différents entre eux ($P < 0,001$) ; dans le cas du protocole ambigu, les deux premiers groupes sont différents entre eux ($P < 0,05$) et différents du dernier ($P < 0,001$), et tous sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$). . . 172

5.3 Proportions d'abeilles non apprenantes (en blanc) et d'abeilles apprenantes utilisant préférentiellement la stratégie élémentaire (en noir) ou non élémentaire (en gris) dans le cadre du *feature* négatif aversif. Pour le protocole simple non ambigu ($A^+ BC^-$, à gauche) il apparait que 55% des abeilles sont capables de résoudre la tâche d'apprentissage, et ce *a priori* selon une résolution de type élémentaire. En parallèle pour le protocole ambigu ($A^+ AB^-$, à droite), 45% des abeilles sont capables d'apprendre et ce par la voie non élémentaire. Les 55% restants (ou 45% pour la condition contrôle) ne parviennent pas à apprendre le protocole. Les différences statistiques ont été obtenues par le calcul du test de Dunnett : dans le cas du protocole simple, le deuxième groupe est différent ($P < 0,001$) ; dans le cas du protocole ambigu, le premier groupe est différent ($P < 0,001$) et seuls les deux premiers sont différents par rapport aux groupes correspondants de la condition contrôle ($P < 0,001$). 176

ABSTRACT

AUTHOR : Constance BOITARD

TITLE : Identification of neurobiological circuits involved in ambiguous olfactory learning abilities in honey bees.

ABSTRACT Associative learning spans different levels of complexity, from simple tasks involving simple causal relationships between events, to ambiguous tasks, in which animals have to solve complex discriminations based on non-linear associative links. We focused on two protocols presenting a temporal or configural ambiguity at the level of stimulus contingencies in honey bees (*Apis mellifera*). We performed selective blockades of GABAergic signalisation from recurrent feedback neurons in the mushroom bodies (MBs), higher-order insect brain structures associated with memory storage and retrieval, and found that this blockade within the MB calyces impaired both ambiguous learning tasks, although it did not affect simple conditioning counterparts.

We suggest that the A3v cluster of the GABA feedback neurons innervating the MBs calyces are thus dispensable for simple learning, but are required for counteracting stimulus ambiguity in complex discriminations in honey bees.

KEYWORDS : cognition, insect, honey bee, neurobiology, GABA, feedback neurons, learning.

RESUME

AUTEUR : Constance BOITARD

TITRE : Identification des réseaux neurobiologiques gouvernant les apprentissages ambigus chez l'abeille.

DIRECTEURS DE THESE : Pr Martin GIURFA, Dr Guillaume Isabel.

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : Toulouse, le 28 septembre 2015.

L'apprentissage associatif recouvre des niveaux variables de complexité, des tâches cognitives simples jusqu'à des tâches complexes qui nécessitent la résolution de discriminations ambiguës. Cette thèse traite de deux protocoles présentant des ambiguïtés chez l'abeille, au cours desquels le blocage de la signalisation GABAergique des neurones récurrents sur les corps pédonculés, structures cérébrales majeures de l'apprentissage, est à l'origine de la perte de capacité de résolution ambiguë. Ces neurones, non requis pour les apprentissages simples, semblent donc indispensables à la résolution des ambiguïtés propres aux discriminations cognitives complexes et élaborées chez l'abeille.

MOTS-CLES : cognition, insecte, abeille, neurobiologie, GABA, neurones récurrents, apprentissage.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : ED BSB, spécialité Neurosciences.

LABORATOIRE : Centre de Recherches sur la Cognition Animale (UMR 5169, UPS-CNRS), 118 Route de Narbonne, Bât IV R3, F-31062 Toulouse Cedex 09.