

EFFETS DE L'IMIDACLOPRIDE SUR L'APPRENTISSAGE CHEZ L'ABEILLE *APIS MELLIFERA*

M. Gauthier, J. Pradel, S. Raymond, M. Lambin

Laboratoire de Neurobiologie de l'Insecte, Université Paul Sabatier, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex.

RÉSUMÉ

L'imidaclopride est un insecticide de la famille des néonicotinoïdes qui agit comme un activateur des récepteurs nicotiniques, présents uniquement dans le système nerveux central de l'insecte. Des antagonistes des récepteurs nicotiniques injectés dans le cerveau de l'abeille perturbent l'apprentissage et la mémorisation du conditionnement olfactif de la réponse d'extension du proboscis (REP). Nous faisons l'hypothèse que l'imidaclopride, à des doses sublétales, se comporte comme un agoniste des récepteurs et améliore les capacités d'apprentissage et de mémoire chez l'abeille. L'effet de la molécule a été testé sur deux types d'apprentissage, l'habituation de la REP et le conditionnement olfactif discriminatif de cette réponse. La molécule facilite l'habituation de la REP 15 mn, 30 mn et 1 h après une application topique sur le thorax (1 μ l; 1,25 ng / abeille). Comparée aux témoins recevant du solvant, la molécule injectée dans l'hémolymphe cérébrale (0,5 μ l; 0,127 ng / abeille) ne modifie pas les capacités d'apprentissage olfactif discriminatif ni les capacités de rétention testées 1h et 6h après le conditionnement. Le taux de réponses conditionnées est augmenté de façon aspécifique au délai de 24 heures. Ces résultats montrent qu'une activation du système cholinergique facilite l'apprentissage non associatif (habituation de la REP) et n'induit pas de modifications majeures de l'apprentissage associatif de type pavlovien (conditionnement olfactif discriminatif).

INTRODUCTION

Un nouvel insecticide est utilisé en enrobage des semences dont la matière active est l'imidaclopride, une molécule appartenant à la famille des néonicotinoïdes. Cette molécule, très toxique chez l'insecte, exerce son action par le biais de l'activation des récepteurs nicotiniques présents dans le cerveau et impliqués dans la transmission synaptique au sein des voies utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur (Buckingham et al. 1997; Déglise et al. 2002; Liu et Casida 1993). Des injections intracérébrales d'antagonistes nicotiniques chez l'abeille nous ont permis de montrer que le blocage des voies cholinergiques perturbe les processus d'apprentissage et de mémorisation d'un conditionnement olfactif (Cano Lozano et al. 2001). Nous faisons l'hypothèse que l'imidaclopride, à des doses sublétales, se comporte comme un agoniste des récepteurs nicotiniques et pourrait induire ainsi une facilitation de l'apprentissage. L'effet de la molécule à faible dose a donc été recherché sur l'habituation de la réponse d'extension du proboscis (REP) et sur le conditionnement olfactif de ce réflexe.

La REP est facilement provoquée par la stimulation des antennes avec une goutte d'eau sucrée. Lorsque cette stimulation est répétée plusieurs fois à de courts intervalles de temps et sans que l'abeille soit nourrie, la REP finit par disparaître. Il s'agit d'un apprentissage très simple, entrant dans la catégorie des apprentissages non-associatifs, appelé habituation.

La stimulation gustative des antennes peut également être couplée à une stimulation olfactive selon une procédure pavloviennne. Il s'agit alors d'un apprentissage associatif dans lequel la stimulation gustative ou stimulus inconditionnel (SI) constitue le renforcement de la stimulation olfactive ou stimulus conditionnel (SC). Du fait de l'association, l'odeur acquiert la valeur du SI et devient susceptible de provoquer la REP lorsqu'elle est présentée seule. Un conditionnement discriminatif est ici utilisé dans lequel une odeur associée au stimulus sucré (SC+) est présentée en alternance avec une odeur non renforcée (SC-). Ce type de protocole permet de tester les capacités de discrimination de l'abeille et la spécificité de l'association SC-SI.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des abeilles butineuses *Apis mellifera*, prélevées à l'entrée de la ruche, sont maintenues individuellement en contention dans de petits tubes laissant la tête et les pattes prothoraciques libres de tout mouvement. Les abeilles sont soumises à un jeûne de deux heures avant le début des expérimentations.

L'imidaclopride (Cluzeau, France) a été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO; Sigma, St Louis, MO) pour obtenir une solution à 10^{-1} M. La concentration finale de la solution a été obtenue après dilution de la solution mère dans du liquide physiologique. Les groupes contrôles sont traités avec du DMSO dilué dans du liquide physiologique dans les mêmes proportions.

Le produit a été appliqué de façon topique sur le thorax ($1 \mu\text{l}$; 1,250 ng / abeille soit une concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ M) dans les expériences portant sur l'habituation. Nous avons précédemment montré que cette dose ne modifie pas les composantes gustative et motrice du réflexe (Lambin et al. 2001). Une injection dans l'hémolymphe cérébrale ($0,5 \mu\text{l}$; 0,127 ng / abeille, soit une concentration de 10^{-6} M) a été effectuée dans les expériences portant sur le conditionnement olfactif.

Habituation. Les abeilles sont soumises à la stimulation répétée d'une seule antenne avec de l'eau sucrée (50% p/v) avec un intervalle de 1 mn entre les stimulations. Le critère d'habituation est de trois stimulations gustatives consécutives ne provoquant pas la REP. Lorsque ce critère est atteint, l'antenne non utilisée est stimulée avec l'eau sucrée afin de vérifier que le réflexe est toujours présent et d'écartier l'éventualité d'une fatigue musculaire. Les abeilles ne répondant pas à ce test de récupération sont éliminées. L'apprentissage est effectué 15 mn, 30 mn et 1h après l'application de la solution chez trois lots d'abeilles indépendants.

Conditionnement olfactif discriminatif. L'odeur de café et le géraniole sont utilisés aléatoirement comme odeur renforcée (SC+) et non renforcée (SC-). Chaque odeur est présentée pendant 6 sec au niveau des antennes. Lorsque l'odeur est renforcée, la stimulation gustative des antennes est appliquée 3 sec après le début de la stimulation olfactive pour une durée de 6 sec. L'extension du proboscis est récompensée par le prélèvement d'une goutte de sucre par l'abeille pendant 6 sec. La séance de conditionnement comporte 3 SC+ et 3 SC-, présentés dans un ordre aléatoire. Les tests consistent à présenter le SC+ et le SC-, en ordre aléatoire, 1 h, 6 h et 24 h après l'apprentissage sans associer de renforcement alimentaire. Le conditionnement est effectué 30 mn après l'injection de la solution dans l'hémolymphe cérébrale.

ANALYSE DES DONNÉES

Les données relatives à l'habituation ont été traitées selon une analyse de variance (ANOVA) et un test t de Student. Concernant l'acquisition et la rétention du conditionnement olfactif, un test de χ^2 a été effectué sur le nombre de réponses conditionnées relevées dans chacun des groupes.

Les valeurs de p inférieures 0,05 sont considérées comme significatives.

RÉSULTATS

Habituation. Traitées à la dose de 1,25 ng, les abeilles recevant de l'imidaclopride atteignent le critère d'habituation de la REP en un nombre d'essais significativement plus faible que celui enregistré chez les abeilles traitées au solvant ou ne recevant pas de traitement (Fig. 1). Le délai n'a pas d'effet sur la facilitation observée, elle est maximale dès le quart d'heure qui suit l'application du produit.

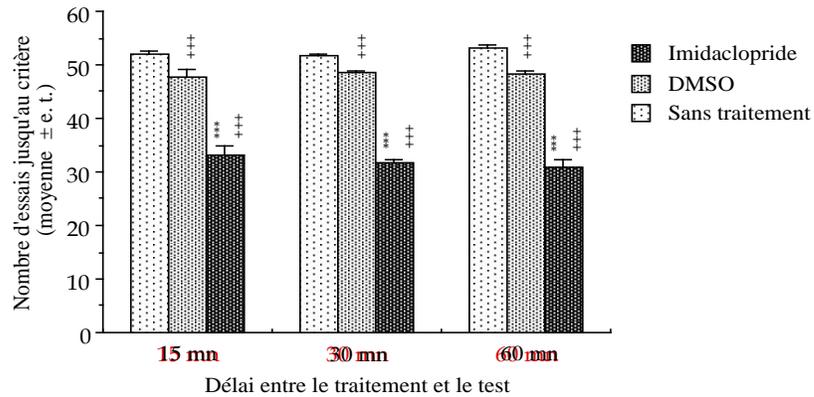


Figure 1: nombre d'essais pour atteindre le critère d'habituation chez les animaux témoins (sans traitement), ayant reçu une application topique de DMSO ou d'imidaclopride (1,25 ng / abeille) 15 mn, 30 mn ou 1 h avant l'apprentissage. n = 20 dans chaque groupe. +++: comparaison avec les témoins sans traitement; p < 0,001 ***: comparaison avec DMSO; p < 0,001

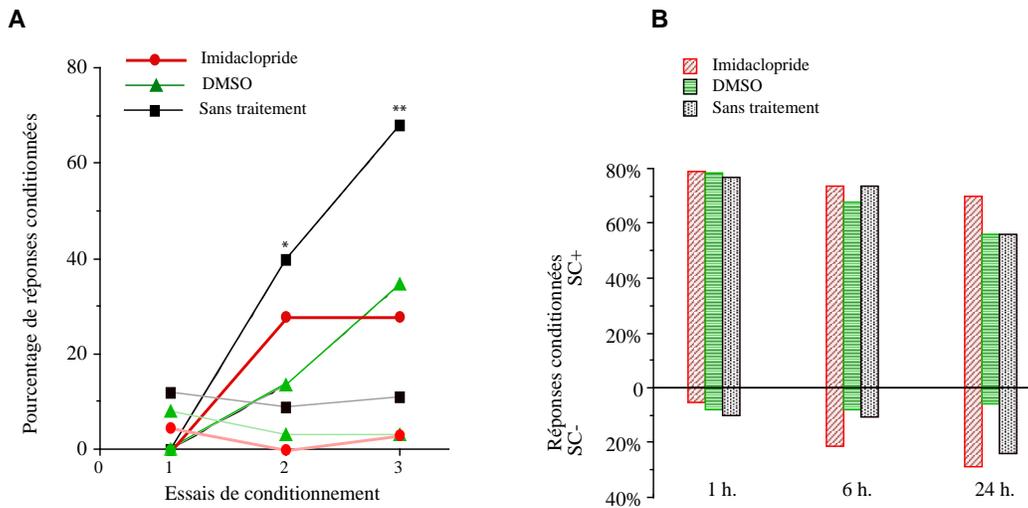


Figure 2: effets de l'injection d'imidaclopride dans l'hémolymphe cérébrale réalisée 30 mn avant le conditionnement sur le pourcentage de réponses conditionnées à l'odeur renforcée (SC+, traits pleins) et à l'odeur non renforcée (SC-, pointillés) obtenu lors de l'acquisition (A) et lors des tests de rétention effectués 1h, 6h et 24h après l'apprentissage (B).

A: Imidaclopride et Sans traitement n = 39, DMSO n = 37;
 B: Imidaclopride délais 1h et 6h n = 38, délai 24h n = 29; DMSO délais 1h et 6h n = 37, délai 24h n = 29; Sans traitement délai 1h n = 39, délai 6h n = 38, délai 24h n = 29

* p < 0.05; ** p < 0.01 (Comparaison du taux de réponses au SC+ entre les 3 groupes)

Conditionnement olfactif. Les trois groupes d'abeilles apprennent à discriminer l'odeur associée au renforcement (SC+) de l'odeur non renforcée (SC-) comme le montrent les pourcentages de réponses conditionnées reportés dans la figure 2A. Cependant, l'évolution des performances est significativement différente entre les trois groupes (au 2^{ème} essai,

$p < 0.05$, au 3^{ème} essai $p < 0.01$). La performance finale des groupes recevant le solvant et l'imidaclopride (respectivement 28 et 35%) est inférieure à celle des témoins sans traitement (74%). Ceci laisse supposer que l'injection d'une solution dans l'hémolymphe cérébrale entraîne une perturbation des animaux. Cette perturbation ne peut cependant pas être interprétée comme un déficit d'apprentissage en regard des taux de réponses au SC+ et au SC- obtenus 1h et 6h après le conditionnement chez les trois groupes (Figure 2B). Après 24h, le taux de rétention diminue chez les groupes DMSO et témoin, correspondant probablement à un début d'oubli. Ceci ne s'observe pas chez le groupe traité à l'imidaclopride mais le taux de réponse élevé au SC- montre une perte de la discrimination et suggère une activation aspécifique des animaux (différence non significative entre les 3 groupes).

CONCLUSION

L'imidaclopride est une molécule toxique pour l'insecte, y compris pour l'abeille mais cet effet dépend de la durée d'exposition et de la dose reçue. Il a été montré récemment qu'une ingestion chronique (14 jours) d'une faible dose (1,5 ng / abeille) induit des perturbations de l'apprentissage olfactif (Decourtye, 2002). Une dose équivalente (1,25 ng/ abeille) en application unique sur le thorax n'a pas d'effet sur le seuil de la perception gustative et provoque une augmentation de l'activité locomotrice chez l'abeille (Lambin et al. 2001). Nous montrons ici que cette même dose facilite l'habituation de la réponse d'extension du proboscis. La dose dix fois plus faible (0,127 ng / abeille) qui a été injectée directement dans l'hémolymphe cérébrale n'induit pas d'effet perturbateur sur l'acquisition et la rétention d'un conditionnement olfactif discriminatif. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Decourtye (2002) après une ingestion unique d'imidaclopride à la dose de 0,12 ng. Un léger effet facilitateur aspécifique est observé au délai de 24 h qui pourrait être mis en relation avec une augmentation du métabolisme neuronal provoqué par la molécule (Armengaud et al. 2000). Ainsi, notre hypothèse que l'imidaclopride à une dose sublétale facilite l'apprentissage est vérifiée, au moins en ce qui concerne un apprentissage non associatif. Nous n'excluons pas qu'une facilitation du conditionnement olfactif puisse être observée avec une dose de 1,25 ng / abeille, renforçant notre hypothèse que l'imidaclopride se comporte comme un agoniste du système cholinergique.

REFERENCES

- Armengaud, C., Causse, N., Aït-Oubah, J., Ginolhac, A., Gauthier, M., 2000, Functional cytochrome oxidase histochemistry in the honeybee brain. *Brain Res*, 24, 859(2), 390- 393.
- Buckingham S D, Lapied B, Le Corrionc H, Grolleau F, Satelle B. 1997. Imidacloprid actions on insect neuronal acetylcholine receptors. *J Exp Biol* 200: 2685-2692.
- Cano Lozano, V., Armengaud, C., Gauthier, M., 2001 Memory impairment induced by cholinergic antagonists injected into the mushroom bodies of the honeybee. *J. Comp. Physiol. A*, 187:249-254.
- Decourtye, A., Etude de l'impact de produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera*). Thèse de l'Université de Paris-sud (XI), 2002.
- Déglise, P., Grünewald, B., Gauthier, M. 2002 The insecticide imidacloprid is a partial agonist of the honey bee neuronal nicotinic receptor. *Neurosci. Lett.* 321 (1-2):13-16
- Lambin, M., Armengaud, C., Raymond, S., Gauthier, M. 2001 Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives. Insect Biochem. Physiol.* 48:129-134
- Liu M-Y, Casida J E. 1993. High affinity binding of [³H]Imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic Biochem Physiol.* 46: 40-46.