

**PERFORMANCES D'APPRENTISSAGE OLFACTIF CHEZ L'ABEILLE:
VARIATIONS EN FONCTION DE L'AGE DES OUVRIERES ET ETUDE
COMPARATIVE DES REPONSES DES REINES ET DES MALES**

David LALOI, Marie GALLOIS & Minh-Hà PHAM-DELEGUE

*Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés, INRA,
BP 23, 91440 Bures-sur-Yvette, France*

Résumé: Chez l'abeille, les performances d'apprentissage olfactif obtenues au cours d'un conditionnement du réflexe d'extension du proboscis, procédure très standardisée, s'avèrent fortement variables au niveau individuel. Afin de préciser les causes possibles de cette variabilité, nous avons étudié les performances d'apprentissage en fonction de l'âge des ouvrières et, de manière comparative, les réponses des reines et des mâles. Les performances des ouvrières les plus jeunes (2 jours) diffèrent de celles des abeilles plus âgées: l'acquisition et la résistance à l'extinction sont plus faibles, à l'inverse les réponses spontanées sont plus élevées. Ce résultat peut être relié au développement du système nerveux olfactif, dont la maturation se poursuit pendant les premiers jours de la vie imaginale. Chez les ouvrières plus âgées (4 à 20 jours), nos données ne montrent pas de variation importante des réponses. Les reines et les mâles montrent des performances différentes de celles des ouvrières: les reines apprennent bien mais présentent des réponses moins discriminatives et une résistance à l'extinction plus élevée, les mâles présentent de moins bonnes performances tant en terme d'acquisition que de discrimination. Les différences entre les réponses des trois types d'individus semblent liées à l'importance relative des signaux odorants en fonction des tâches qu'ils réalisent.

Mots clés: *abeille, Apis mellifera, apprentissage olfactif, variabilité individuelle*

Summary: **Olfactory learning in the honey bee: changes with ageing in workers' performances, and comparative study of queens and drones responses.** The conditioning of the proboscis extension was widely used to study olfactory learning in the honey bee. Although this procedure was highly standardised, the responses showed an important inter-individual variability. In order to precise possible sources of such a variability, we analysed the effect of age on the performances of workers, and comparatively studied the responses of queens and drones. Age was shown to affect the responses of workers, with the youngest bees (2-days old) exhibiting poor acquisition performances and low resistance to extinction, but more spontaneous responses than older ones. The performances of workers from 4- to 20-days old did not vary significantly. These results may be due to developmental aspects, since the olfactory nervous system is still maturing during the first days of the adult life. The proboscis extension responses of queens and drones differed from those of worker bees. Queens exhibited a good acquisition level, but their responses were less discriminative and more resistant to an extinction process than those of workers. Drones showed on average lower learning performances compared to females. Differences observed according to

the type of individuals might be related to the respective role of olfactory signals according to their task specialisation.

Key words: *honey bee, Apis mellifera, olfactory learning, individual variability*

INTRODUCTION

L'aptitude d'un individu à modifier ses comportements à la suite d'un apprentissage est un des facteurs-clés de la survie des animaux et de leur capacité à se reproduire. De ce fait, la variabilité interindividuelle des performances d'apprentissage peut jouer un rôle adaptatif fondamental, et il est particulièrement intéressant de comprendre pourquoi et comment se maintient la variabilité des performances d'apprentissage.

Compte tenu de l'importance des odeurs pour l'abeille, de nombreux travaux sur l'apprentissage chez cet insecte se sont plus particulièrement intéressés au traitement des informations olfactives. La procédure de conditionnement de l'extension du proboscis est, depuis longtemps, un des essais biologiques les plus utilisés pour ce type d'étude. Malgré le caractère très standardisé de cette procédure d'apprentissage, d'importantes variations individuelles des performances ont été rapportées (Getz et al., 1986; Getz & Smith, 1987; Smith et al., 1991). Divers facteurs ont été indiqués comme causes possibles de cette variabilité, quelques-uns ayant déjà fait l'objet d'études spécifiques: âge des abeilles (Pham-Delègue et al., 1990; Ray & Ferneyhough, 1997a), caste, spécialisation comportementale des individus, génotype (Brandes & Menzel, 1990; Bhagavan et al., 1994), saison (Ray & Ferneyhough, 1997b), état de motivation alimentaire, ou encore expériences antérieures. Toutefois les différents travaux n'aboutissent pas tous à des résultats convergents, en particulier dans le cas des variations liées à l'âge des abeilles. En outre, il apparaît au regard de cette littérature, qu'une analyse plus précise de la variabilité des performances d'apprentissage est nécessaire à une meilleure compréhension des capacités des abeilles à utiliser des signaux odorants naturels.

Afin de préciser le rôle de certains facteurs sur les performances d'apprentissage, nous avons, d'une part étudié l'évolution des performances d'apprentissage en fonction de l'âge des ouvrières et, d'autre part, analysé de manière comparative les réponses des individus reproducteurs, reines et mâles.

MATERIEL ET METHODES

Conditionnement olfactif de l'extension du proboscis

La méthode expérimentale repose sur un essai biologique qui reproduit l'apprentissage d'une association odeur-nourriture, telle qu'elle se produit en conditions naturelles lors des visites des abeilles sur les fleurs: le conditionnement du réflexe d'extension du proboscis. Le dispositif expérimental, les conditions de stimulation, et les

procédures de conditionnement, sont adaptés du travail de Bitterman et al. (1983) et ont été décrits en détails par ailleurs (Pham-Delègue et al., 1993; Sandoz et al., 1995).

Expérience 1: Performances d'apprentissage des ouvrières en fonction de l'âge

Les ouvrières d'abeille, de la race italienne (*Apis mellifera ligustica* L.), sont prélevées à l'émergence sur des cadres de couvain, et placées dans des cagettes d'élevage par groupe de 60-70 individus. Elles sont maintenues en étuve (33°C, 55% d'humidité relative, obscurité) jusqu'à l'âge requis pour les expériences. Elles sont approvisionnées en nourriture sucrée et en eau *ad libitum*, ainsi qu'en pollen (apport protéique) au cours des huit premiers jours. Nous avons testé dix groupes indépendants, âgés respectivement de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 et 20 jours (effectifs compris entre 50 et 69 individus dans chaque groupe).

Chaque ouvrière est soumise à une procédure expérimentale constituée de 3 essais de conditionnement (associations odeur-nourriture sucrée), suivis de 5 essais d'extinction (présentations de l'odeur seule), les huit essais (6 secondes par essai) étant appliqués à intervalles réguliers de 15 minutes. L'odeur utilisée comme stimulus conditionnel était du linalol, composé courant des arômes floraux. Les réponses des ouvrières sont enregistrées à trois essais particuliers de la procédure: (1) *Réponse spontanée* à l'odeur au premier essai, avant la présentation du renforcement alimentaire, c'est-à-dire avant le conditionnement. Comme il n'est pas possible de savoir si les abeilles qui répondent spontanément, apprennent réellement l'odeur par la suite, ces individus ne sont pas pris en compte dans l'analyse des réponses ultérieures. (2) Réponse conditionnée au quatrième essai, c'est-à-dire à la fin de la phase de conditionnement, qui indique la performance d'*acquisition*. (3) Réponse conditionnée au dernier essai, c'est-à-dire à la fin de la phase d'extinction, qui indique la *résistance à l'extinction*.

Expérience 2: Comparaison des performances d'apprentissage des ouvrières, des reines et des mâles

Les reines ont été produites en nombre selon la technique de transfert de larves (Ruttner, 1983), à partir de jeunes larves provenant de colonies d'abeille de race italienne (*Apis mellifera ligustica* L.). Dès leur operculation, les cellules royales sont placées individuellement dans des cagettes avec une dizaine d'ouvrières accompagnatrices qui assurent le nourrissage de la reine après émergence. Les mâles ont été produits, également dans des ruches de race italienne, en plaçant un cadre de cire à grandes cellules, ce qui stimule l'élevage de mâles. Ils sont collectés à l'émergence et placés par groupe de 10 dans des cagettes avec une cinquantaine d'ouvrières accompagnatrices qui assurent leur nourrissage. Les ouvrières sont préparées selon un protocole identique à celui décrit dans l'expérience 1. Les reines vierges (effectif testé N=41), les mâles (N=32), et les ouvrières (N=101) sont ensuite maintenus en étuve jusqu'à l'âge de quinze jours, moment où nous les avons testés.

Nous avons appliqué ici une procédure de conditionnement discriminatif (Bitterman et al., 1983; Smith et al., 1991), au cours de laquelle deux stimuli odorants sont présentés en alternance, l'un étant associé à un renforcement (stimulus positif), le deuxième étant non renforcé (stimulus négatif). Le linalol a été utilisé comme stimulus positif, et le phényl-éthyl-isothiocyanate comme stimulus négatif. Chaque individu est

soumis à 5 essais de conditionnement, constitués d'une stimulation avec du linalol associé à un renforcement alimentaire sucré, qui alternent avec des présentations du phényl-éthyl-isothiocyanate seul (les deux composés étant d'origine florale). A la suite de ce conditionnement discriminatif, les abeilles sont soumises à une procédure d'extinction constituée de 8 présentations du linalol sans renforcement. La procédure expérimentale complète permet donc d'enregistrer l'*acquisition* de la réponse conditionnée, la performance de *discrimination*, et la *résistance à l'extinction*.

Analyse statistique

Les taux de réponses des ouvrières des différents groupes d'âge (expérience 1) ont été comparés à une distribution théorique uniforme par un test de χ^2 d'homogénéité. Quand ce test a montré que la distribution n'était pas uniforme, les réponses des différents groupes d'âge ont été comparées deux-à-deux par des tests de χ^2 à 1 degré de liberté, en appliquant une correction de seuil selon la méthode de Dunn-Sidak.

Pour la comparaison des réponses des ouvrières, des reines, et des mâles, trois valeurs numériques ont été attribuées à chaque abeille, correspondant respectivement au nombre de réponses au stimulus renforcé (linalol) au cours de la phase d'acquisition, au nombre de réponses au stimulus négatif (phényl-éthyl-isothiocyanate) c'est-à-dire à la performance de discrimination, et au nombre de réponses au cours de la phase d'extinction. Ces valeurs sont comparées par un test de Kruskal-Wallis. Si ce test indique une hétérogénéité parmi les trois groupes, un test non paramétrique de comparaisons multiples est effectué selon la méthode de Noether.

RESULTATS

Expérience 1: Performances d'apprentissage des ouvrières en fonction de l'âge

L'analyse indique des variations significatives, en fonction de l'âge des ouvrières, pour les trois paramètres mesurés (figure 1): les réponses spontanées au linalol ($\chi^2=27,71$; $p<0,01$; 9 ddl), l'acquisition de la réponse conditionnée ($\chi^2=21,49$; $p<0,05$; 9 ddl), et la résistance de cette réponse à une procédure d'extinction ($\chi^2=35,75$; $p<0,001$; 9 ddl).

Les comparaisons multiples permettent de préciser que cet effet de l'âge repose essentiellement sur les réponses des abeilles les plus jeunes. En effet les ouvrières âgées de 2 jours montrent des réponses spontanées plus élevées que les individus plus âgés (35% d'individus qui répondent vs. moins de 25% chez les groupes âgés de 4 jours et plus), une performance d'acquisition plus faible (59% vs. plus de 72%), et une moindre résistance à l'extinction (10% vs. plus de 37%).

Chez les ouvrières âgées de 4 jours et plus, seule la résistance à l'extinction montre des variations significatives entre les différents groupes d'âge, les ouvrières âgées de 12, 14 et 20 jours présentant les taux de réponses les plus élevés (entre 55 et 70%).

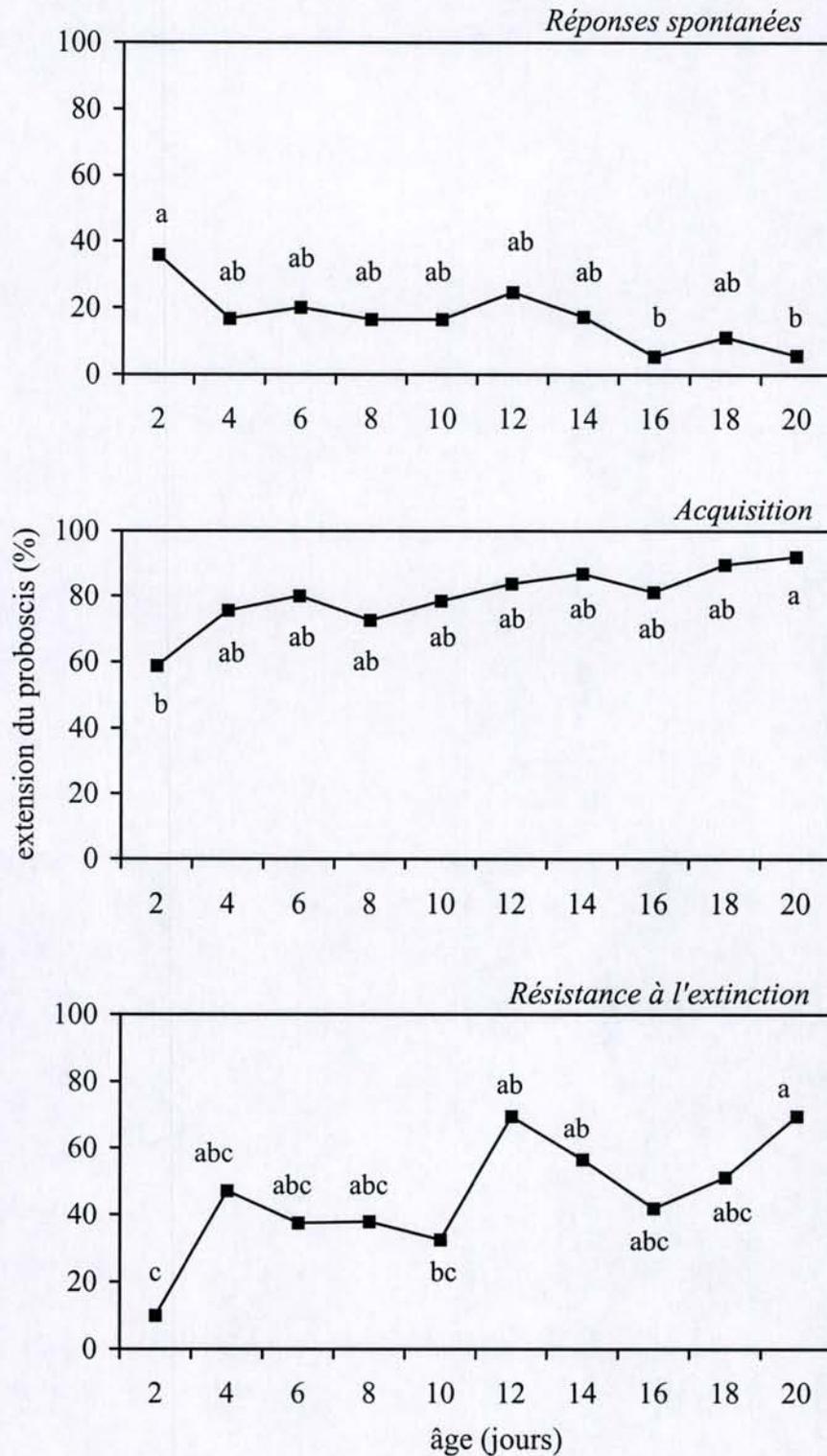


Figure 1. Réponses spontanées au linalol, acquisition de la réponse conditionnée, et résistance à l'extinction, en fonction de l'âge des ouvrières. Les lettres représentent le résultat des comparaisons deux-à-deux, des lettres différentes indiquant des différences significatives.

Figure 1. Spontaneous responses to linalool, acquisition performance, and resistance to extinction, presented as a function of the workers' age. Different letters indicate different response levels when two-by-two comparisons were done.

Expérience 2: Comparaison des performances d'apprentissage des ouvrières, des reines et des mâles

L'analyse montre que les réponses diffèrent de manière significative entre les trois catégories d'individus (figure 2), que ce soit pour l'acquisition de la réponse conditionnée ($H=56,76$; $p<0,001$; 2 ddl), pour la performance de discrimination ($H=29,70$; $p<0,001$; 2 ddl), ou pour la résistance à l'extinction ($H=37,74$; $p<0,001$; 2 ddl).

Les comparaisons multiples permettent de préciser les différences entre ouvrières, reines et mâles. Concernant l'acquisition, les réponses des ouvrières et des reines ne diffèrent pas, alors que les mâles montrent un apprentissage significativement plus faible. Par ailleurs les ouvrières montrent des réponses plus discriminatives que celles des reines et des mâles, c'est-à-dire qu'elles répondent moins à l'odeur non renforcée, le phényl-éthyl-isothiocyanate. Les réponses des reines et des mâles ne sont pas significativement différentes. Enfin concernant l'extinction, les réponses des ouvrières et des mâles ne diffèrent pas, mais les reines montrent une résistance à l'extinction plus importante, le taux de réponse au linalol se maintenant à des valeurs élevées même après plusieurs présentations non renforcées de l'odeur.

DISCUSSION

Chez les ouvrières, seule catégorie d'individus largement étudiée jusqu'à présent, la plupart des travaux sur la variabilité des performances d'apprentissage ont surtout considéré l'acquisition de la réponse conditionnée. Nos résultats montrent que les réponses spontanées, les capacités de discrimination, et la résistance à l'extinction sont des critères dont il est pertinent d'étudier la variabilité. Par ailleurs, les reines et les mâles présentent des réponses différentes de celles des ouvrières, et il peut être intéressant de rechercher le déterminisme de ces différences.

En considérant l'ensemble des trois paramètres sur lesquels un effet de l'âge a été recherché, il apparaît que les réponses des ouvrières les plus jeunes, âgées de 2 jours, diffèrent de celles des abeilles plus âgées de manière systématique : leurs réponses spontanées sont plus élevées, et leur performance d'apprentissage, tant en terme d'acquisition de la réponse conditionnée que de résistance à l'extinction, sont plus faibles. Ces performances caractéristiques des ouvrières les plus jeunes semblent en relation avec le développement du système olfactif, dont la maturation se poursuit au cours des premiers jours de la vie imaginale. Des études neuroanatomiques et neurophysiologiques ont montré que, pendant cette période de maturation, le système olfactif de l'abeille était particulièrement plastique en réponse aux changements de l'environnement odorant (Masson & Arnold, 1987; Masson et al., 1993). Les niveaux élevés de réponse spontanée, enregistrés chez les ouvrières âgées de 2 jours, pourraient être liés à une sensibilité supérieure au cours de cette période pendant laquelle les odeurs de l'environnement sont susceptibles d'influencer la mise en place définitive du système nerveux olfactif. En outre, les faibles performances d'apprentissage au même âge, pourraient être une conséquence directe de l'immaturité du système, en terme de capacité à traiter et à mettre en mémoire une information.

Chez les ouvrières âgées de 4 jours et plus, le taux de réponse spontanée et la performance d'acquisition ne varient pas significativement avec l'âge. Par contre, les variations sensibles sont observées dans la résistance à l'extinction. Ces variations rappellent de plus les résultats obtenus par Pham-Delègue et al. (1990) pour l'acquisition d'une autre odeur, le géraniol. Ces variations pourraient être liées à l'état physiologique des abeilles. Dans une procédure expérimentale comportant de nombreux essais, l'état de satiété et donc de motivation alimentaire, ainsi que l'épuisement des abeilles, peuvent être source de variabilité des performances. Si ces facteurs physiologiques varient différemment avec l'âge des ouvrières, ils peuvent induire des différences dans les performances d'apprentissage de groupes d'âges différents. Toutefois, une autre hypothèse peut être proposée, qui relie les variations des réponses olfactives aux tâches que l'abeille doit remplir au cours de sa vie. En effet, la résistance à l'extinction de la réponse conditionnée au linalol, composé odorant d'origine florale, semble plus importante chez les ouvrières âgées de plus de 12 jours comparées aux plus jeunes. Cette période correspond à l'âge moyen auquel les ouvrières deviennent butineuses en conditions naturelles (Ribbands, 1952; Seeley, 1982; Kolmes, 1985), et on peut supposer qu'une plus grande résistance à l'extinction de la réponse conditionnée puisse être en relation avec l'importance de l'apprentissage de signaux odorants, en particulier d'origine florale, à ce moment de la vie de l'ouvrière.

Les reines d'abeille apprennent aussi bien que les ouvrières, en terme d'acquisition de la réponse conditionnée, mais présentent des réponses moins discriminatives, moins sélectives, et une résistance à l'extinction plus importante. Les mâles apprennent moins bien que les ouvrières et les reines. Ils montrent par la suite peu de capacités de discrimination, et une faible résistance à l'extinction, mais ces deux derniers types de réponses découlent peut-être de la faible performance d'acquisition. Les reines, les mâles et les ouvrières, ont des répertoires comportementaux très différents et, de ce fait, n'utilisent vraisemblablement pas les mêmes signaux odorants dans les mêmes situations. En particulier, seules les ouvrières butinent, comportement qui implique la mémorisation et la reconnaissance d'arômes floraux, signaux odorants complexes et extrêmement variables. Ce sont justement les ouvrières qui présentent les performances les plus adéquates pour une utilisation efficace de tels signaux: acquisition rapide d'une information olfactive, apprentissage sélectif et, finalement, extinction rapide d'une réponse conditionnée quand l'odeur apprise a perdu sa valeur prédictive comme c'est le cas au cours d'une procédure d'extinction.

Les performances d'apprentissage olfactif varient fortement en relation avec les facteurs étudiés, l'âge des individus, ainsi que la caste et le sexe. Divers éléments indiquent que ces variations présentent un caractère adaptatif, en liaison avec les activités de chaque individu à un moment donné de sa vie, ce qui avait déjà été suggéré par divers travaux sur le partage des tâches chez les ouvrières (Palmquist Momot & Rothenbuhler, 1971; Pham-Delègue et al., 1990; Ray & Ferneyhough, 1999). Sur la base de processus d'apprentissage et de mémorisation généraux à l'espèce, il existe sans doute des mécanismes permettant d'adapter les performances de chaque individu à ses besoins et/ou aux besoins de la colonie.

REFERENCES

- Bhagavan, S., Benatar, S., Cobey, S. and B.H. Smith, 1994. Effect of genotype but not of age or caste on olfactory learning performance in the honey bee, *Apis mellifera*. *Anim. Behav.* 48 : 1357-1369.
- Bitterman, M.E., Menzel, R., Fietz, A. and S. Schäfer, 1983. Classical conditioning of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*). *J. Comp. Psychol.* 97 : 107-119.
- Brandes, C. and R. Menzel, 1990. Common mechanisms in proboscis extension conditioning and visual learning revealed by genetic selection in honeybees (*Apis mellifera capensis*). *J. Comp. Physiol. A* 166 : 545-552.
- Getz, W.M., Brückner, D. and K.B. Smith, 1986. Conditioning honeybees to discriminate between heritable odors from full and half sisters. *J. Comp. Physiol. A* 159 : 251-256.
- Getz, W.M. and K.B. Smith, 1987. Olfactory sensitivity and discrimination of mixtures in the honeybee *Apis mellifera*. *J. Comp. Physiol. A* 160 : 239-245.
- Kolmes, S.A., 1985. A quantitative study of the division of labour among worker honey bees. *Z. Tierpsychol.* 68 : 287-302.
- Masson, C. and G. Arnold, 1987. *Organization and plasticity of the olfactory system of the honeybee, Apis mellifera*. In *Neurobiology and Behavior of Honeybees* (R. Menzel & A. Mercer, Eds.), Springer Verlag, pp. 280-295.
- Masson, C., Pham-Delègue, M.H., Fonta, C., Gascuel, J., Arnold, G., Nicolas, G. and M. Kerszberg, 1993. Recent advances in the concept of adaptation to natural odour signals in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* 24 : 169-194.
- Palmquist Momot, J. and W.C. Rothenbuhler, 1971. Behaviour genetics of nest cleaning in honeybees. VI. Interactions of age and genotype of bees, and nectar flow. *J. Apic. Res.* 10 : 11-21.
- Pham-Delègue, M.H., De Jong, R. and C. Masson, 1990. Effet de l'âge sur la réponse conditionnée d'extension du proboscis chez l'abeille domestique. *C. R. Acad. Sci. Paris* 310 : 527-532.
- Pham-Delègue, M.H., Bailez, O., Blight, M.M., Masson, C., Picard-Nizou, A.L. and L.J. Wadhams, 1993. Behavioural discrimination of oilseed rape volatiles by the honeybee *Apis mellifera* L. *Chem. Senses* 18 : 483-494.
- Ray, S. and B. Ferneyhough, 1997a. The effects of age on olfactory learning and memory in the honey bee *Apis mellifera*. *NeuroReport* 8 : 789-793.
- Ray, S. and B. Ferneyhough, 1997b. Seasonal variation of proboscis extension reflex conditioning in the honey bee (*Apis mellifera*). *J. Apic. Res.* 36 : 108-110.
- Ray, S. and B. Ferneyhough, 1999. Behavioral development and olfactory learning in the honeybee (*Apis mellifera*). *Dev. Psychobiol.* 34 : 21-27.
- Ribbands, C.R., 1952. Division of labour in the honeybee community. *Proc. Roy. Soc. London B* 140 : 32-43.
- Ruttner, F., 1983. *Queen Rearing. Biological Basis and Technical Instruction*. Apimondia, Bucarest, 358 pp.
- Sandoz, J.C., Roger, B. and M.H. Pham-Delègue, 1995. Olfactory learning and memory in the honeybee : comparison of different classical conditioning procedures of the proboscis extension response. *C. R. Acad. Sci. Paris* 318 : 749-755.

- Seeley, T.D., 1982. Adaptative significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 11 : 287-293.
- Smith, B.H., Abramson, C.I. and T.R. Tobin, 1991. Conditional withholding of proboscis extension in honeybees (*Apis mellifera*) during discriminative punishment. *J. Comp. Psychol.* 105 : 345-356.