



HAL
open science

Phéromones et régulation sociale chez l'abeille, *Apis mellifera* L. : Identification d'un inhibiteur du développement comportemental des ouvrières

I. Leoncini

► **To cite this version:**

I. Leoncini. Phéromones et régulation sociale chez l'abeille, *Apis mellifera* L. : Identification d'un inhibiteur du développement comportemental des ouvrières. Sciences du Vivant [q-bio]. Institut National Agronomique Paris Grignon, 2002. Français. NNT: . tel-02833121

HAL Id: tel-02833121

<https://hal.inrae.fr/tel-02833121v1>

Submitted on 7 Jun 2020

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.



Institut National Agronomique Paris-Grignon



Ecole Doctorale ABIES

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Biologie animale

présentée et soutenue publiquement par

Isabelle LEONCINI

soutenu le 10 décembre 2002

**Phéromones et régulation sociale chez l'abeille,
Apis mellifera L. :
Identification d'un inhibiteur du développement
comportemental des ouvrières.**

Pheromones and social regulation in *Apis mellifera* L. honeybees: identification of an inhibitor of the behavioural development of workers.

Directeur de thèse

Yves LE CONTE

Membres du jury :

Rapporteur Minh-Hà PHAM-DELEGUE, Directeur de Recherches, INRA, Bures/Yvette

Rapporteur M. ROUX, Professeur, Université Aix-Marseille III

Examineur C. ERRARD, Maître de Conférences, Université de Tours

Examineur J.L. CLEMENT, Directeur des Relations Internationales, CNRS, Paris

Examineur Y. LE CONTE, Directeur de Recherches, INRA, Avignon

Examineur F. MARION-POLL, Professeur INA P-G, INRA, Versailles

*La vie des abeilles est une source enchantée.
Plus on y puise, plus ses flots se font abondants.*

Karl von Frisch, 1952.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier profondément mon directeur de thèse, Yves Le Conte, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse et de la mener à bien. Je tiens à le remercier pour avoir été toujours disponible et à l'écoute, pour m'avoir guidée dans mon travail, pour la grande autonomie qu'il m'a laissée notamment en me donnant l'opportunité de faire des dosages de JH aux USA. Je le remercie pour m'avoir donné tous les moyens pour avancer dans cette thèse aussi bien sur le plan scientifique, qu'humain et matériel. Grâce à lui j'ai pu découvrir le monde passionnant de l'abeille et toutes les joies de l'apiculture.

J'adresse également mes sincères remerciements au Professeur Gene Robinson, pour sa précieuse collaboration autant scientifique que financière. J'ai été très honorée de pouvoir travailler avec lui et je le remercie pour ses nombreux conseils avisés et pour son accueil. Mon séjour dans son laboratoire a été pour moi une expérience très enrichissante et je tiens d'ailleurs à dire un grand merci à Michelle Elekonich et à Zhi-Yong Huang pour leur aide importante.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe de Biologie et Protection de l'Abeille, J.M. Bécard et D. Crauser pour leur aide dans mes manip et en apiculture, C. Brillet, notamment pour notre collaboration, tous ses petits conseils et pour la relecture du manuscrit.

Je tiens à remercier G. Costagliola pour sa fructueuse et sympathique collaboration et pour tout le temps qu'il a consacré à m'enseigner les secrets de la chimie.

C'est avec une grande sincérité que je remercie le Professeur M. Roux, qui m'a suivie depuis mes années de fac et qui a toujours été présent pour m'aider en stats et pour me conseiller. Je lui suis très reconnaissante.

Je voudrais exprimer ma gratitude à K. Slessor pour sa fourniture de molécules mais surtout pour ses précieux commentaires qui nous ont permis de nous diriger vers l'oléate d'éthyle.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse : M. Roux, M.H. Pham-Delegue, C. Errard, F. Marion-Poll, J.L. Clément.

Je remercie aussi toute l'ancienne équipe de Marseille : M. Renucci, A.G. Bagnères, L. Sreng, A. Tirard et E. Provost.

Je voudrais aussi adresser mes remerciements à A. Lenoir qui a gentiment accepté de relire certaines parties de mon manuscrit.

Un grand merci à toutes les personnes de la station d'Ecologie des Invertébrés de l'INRA d'Avignon pour leur soutien amical notamment à N. Morison et S. Suchail, M. Rieux pour m'avoir permis de participer à certains de ses enseignements et C. Pellissier pour son aide bibliographique. Je garderai un très bon souvenir de mon séjour ici et notamment des petits moments privilégiés passés à la miellerie en compagnie de Jean et de Jean-Paul. J'adresse également toute mon amitié à Marie Jo et à la troupe de théâtre de l'ADAS avec qui j'ai partagé de véritables contes de fées !

Je ne peux pas oublier tous les stagiaires, Karine, Jonat, Thomas, Damien qui ont participé à mon travail. Je garde une pensée toute particulière pour Tamar avec qui j'ai passé d'inoubliables moments au labo. Merci aussi à Isa, Julien, Gérard pour leur bonne humeur et pour leurs coups de main notamment en apiculture.

Un grand merci pour leur gaieté, leur disponibilité et leur réconfort à Nat et Seb, Delph, les 2 Laurettes, Domi, Nel, Patou, Mehrez, Thomas.

Enfin, je garde la place la plus chère dans mon cœur pour mes parents, sans qui je n'aurais jamais pu en arriver là, pour Paul et Isabelle qui m'ont chaleureusement accueillie et soutenue et enfin pour ma sœur, mon plus précieux réconfort...

Résumé

Pour optimiser la division des tâches entre les ouvrières, les butineuses d'une colonie d'abeilles *Apis mellifera* L., inhibent le développement comportemental des ouvrières plus jeunes, empêchant ainsi le butinage précoce. Cette inhibition sociale se transmet par des interactions entre les butineuses et les autres ouvrières de la colonie. Nous avons tenté d'identifier ce signal inhibiteur émis par les butineuses en utilisant deux approches complémentaires, chimique et comportementale.

Une étude comparative du développement comportemental entre trois races d'abeilles : *Apis mellifera caucasica*, *A. m. mellifera* et *A.m. ligustica*, révèle des différences raciales de l'inhibition sociale qui s'exprime uniquement chez *A. m. ligustica*. Nous avons donc utilisé cette race pour tenter d'identifier l'inhibiteur.

Nos résultats montrent que l'inhibition implique des molécules chimiques de contact. De plus, les analyses chimiques en CPG/SM nous ont permis de mettre en évidence un ester d'acide gras, l'oléate d'éthyle, présent majoritairement dans l'abdomen des butineuses. L'effet de l'oléate d'éthyle a été testé sur des abeilles d'âge connu placées dans de petites colonies expérimentales. La molécule ralentit le développement comportemental, empêchant le butinage précoce des abeilles.

L'oléate d'éthyle est un bon candidat pour expliquer l'inhibition du développement des jeunes ouvrières par les butineuses et confirme l'origine phéromonale du signal.

Mots clé : *Apis mellifera* L., régulation sociale, développement comportemental, inhibiteur, oléate d'éthyle, communication chimique, phéromone.

Abstract

Honeybee foragers inhibit the behavioural development of young workers in *Apis mellifera* L. colonies. This inhibitory effect, not yet identified, requires contact between foragers and nest workers. We used behavioural and chemical experiments to characterize the social inhibition.

In comparative studies of the behavioural development of three honeybee races: *Apis mellifera caucasica*, *A. m. mellifera* and *A.m. ligustica*, the social inhibition was observed only in *A.m. ligustica*. Therefore, we used *ligustica* race to characterize the inhibitor.

Our results revealed that contact molecules are involved in the inhibition. Furthermore, a comparative chemical approach (GC:MS) searching for foragers specific compounds led us to find one fatty acid ester, ethyl oleate, in large quantities in the abdomen of foragers. The biological effect of the molecule has been tested on the onset of foraging of known aged bees. Our results suggest that ethyl oleate inhibit the BD of bees preventing them from foraging precociously.

Consequently, ethyl oleate could be part of the inhibition of the behavioural development of young bees by foragers. Those findings provide new evidence of a pheromonal inhibitor.

Key words: *Apis mellifera* L., social regulation, behavioral development, inhibitor, ethyl oleate, chemical communication, pheromone.

Table des matières

<i>Remerciements</i>	5
<i>Résumé</i>	7
<i>Abstract</i>	8
<i>Table des matières</i>	9
<i>Liste des figures</i>	11
<i>Liste des tableaux</i>	13
<i>Introduction</i>	15
<i>Partie 1 Apis mellifera L., un insecte eusocial : le polyéthisme lié à l'âge et ses mécanismes de régulation.</i>	21
<i>I. Le comportement social et ses degrés de complexité</i>	23
<i>II. Le polyéthisme lié à l'âge chez Apis mellifera L.</i>	27
<i>III. Flexibilité du développement comportemental</i>	37
<i>IV. Mécanismes de régulation du polyéthisme lié à l'âge</i>	41
<i>V. Mise en évidence de l'inhibiteur du développement comportemental émis par les butineuses</i>	52
<i>OBJECTIFS</i>	61
<i>Partie 2 Développement comportemental des jeunes ouvrières et pouvoir inhibiteur des butineuses : comparaison entre trois races d'abeilles domestiques (Apis mellifera L.)</i>	63
<i>I. Objectif et principe de l'expérience</i>	65
<i>II. Matériel et méthode</i>	67
<i>III. Résultats</i>	75
<i>IV. Discussion</i>	87

<i>Partie 3 Inhibition comportementale ?</i>	91
<i>I. Objectif et principe de l'étude</i>	93
<i>II. Observation de l'inhibition exercée par les butineuses sur le butinage précoce de jeunes ouvrières</i>	94
<i>III. Interactions sociales spécifiques ?</i>	98
<i>Partie 4 Inhibition chimique de contact ou volatile ?</i>	109
<i>I. Objectif et principe de l'étude</i>	111
<i>II. Matériel et méthodes</i>	112
<i>III. Résultats</i>	116
<i>IV. Discussion</i>	118
<i>Partie 5 Première approche chimique : recherche d'un extrait actif de butineuses.</i>	121
<i>I. Objectif et principe de l'étude</i>	123
<i>II. Effet inhibiteur d'extraits de glandes mandibulaires de butineuses ?</i>	124
<i>III. Effet inhibiteur d'extraits cuticulaires ou céphaliques de butineuses ?</i>	130
<i>Partie 6 Seconde approche chimique : étude comparative des profils chimiques de butineuses et de nourrices.</i>	145
<i>I. Objectif et principe de l'étude</i>	147
<i>II. Comparaison des quantités d'esters d'acides gras entre nourrices et butineuses</i>	149
<i>III. Quantification de l'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps des nourrices et des butineuses</i>	161
<i>IV. Evolution de la quantité d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez deux races d'Apis mellifera L.</i>	177
<i>V. Effet de l'oléate d'éthyle sur le développement comportemental des ouvrières</i>	193
<i>VI. Conclusion de la partie</i>	201
<i>Conclusion générale</i>	203
<i>Bibliographie</i>	217
<i>Annexes</i>	245

Liste des figures

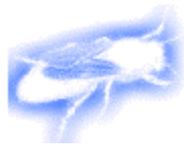
<i>Figure 1 : Polyéthisme lié à l'âge et développement glandulaire</i>	34
<i>Figure 2 : Flexibilité du développement comportemental de l'ouvrière</i>	40
<i>Figure 3 : Les trois niveaux d'organisations biologiques du modèle « activateur-inhibiteur »</i>	56
<i>Figure 4 : Schéma du protocole de l'expérience de comparaisons raciales</i>	69
<i>Figure 5 : Effet de la race des jeunes abeilles et de la race des butineuses âgées sur le pourcentage de butinage des abeilles âgées de 7 à 20 jours</i>	76
<i>Figure 6 : Effet de la race des jeunes abeilles sur les pourcentages cumulés de nouvelles butineuses à 10, 15 et 20 jours</i>	78
<i>Figure 7 : Effet de la race des butineuses âgées (race hôte) sur le butinage des ouvrières à 10, 15 et 20 jours</i>	80
<i>Figure 8 : Effet de la race des jeunes abeilles et de la race des butineuses âgées sur le taux de HJ des abeilles âgées de 7 et 14 jours</i>	82
<i>Figure 9 : Effet de la race des jeunes abeilles sur leur taux d'hormone juvénile</i>	84
<i>Figure 10 : Effet de la race des butineuses âgées (race hôte) sur le taux de JH des ouvrières de 7 et 14 jours</i>	86
<i>Figure 11 : Pourcentage cumulé de nouvelles butineuses dans les colonies avec butineuses âgées ou sans butineuses âgées</i>	96
<i>Figure 12 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 1</i>	103
<i>Figure 13 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 2</i>	104
<i>Figure 14 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 3</i>	105
<i>Figure 15 : Age moyen au butinage des jeunes ouvrières</i>	107
<i>Figure 16 : Schéma du protocole de l'expérience sur la séparation des abeilles avec des grilles simples ou doubles</i>	114
<i>Figure 17 : Effet de la séparation entre butineuses et abeilles émergentes par une simple grille ou une double grille sur l'âge au butinage des abeilles émergentes</i>	116
<i>Figure 18 : Effet des glandes mandibulaires de butineuses sur l'âge au butinage</i>	127
<i>Figure 19 : Compositions des colonies et traitements administrés</i>	132
<i>Figure 20 : Effet global par année des extraits cuticulaires de butineuses ouvrières</i>	134
<i>Figure 21 : Résultats 1999 par série Effet des extraits cuticulaires de butineuses par série</i>	136
<i>Figure 22 : Résultats 2000 par série Effet des extraits cuticulaires de butineuses</i>	137
<i>Figure 23 : Effet global des extraits cuticulaires des 5 premières séries en 1999 et des 3 premières séries en 2000</i>	138

<i>Figure 24 : Effet global par année des extraits céphaliques de butineuses</i>	140
<i>Figure 25 : Résultats 1999 et 2000 par série. Effet des extraits céphaliques de butineuses</i>	141
<i>Figure 26 : Spectre de masse de l'oléate d'éthyle</i>	154
<i>Figure 27 : Spectre de masse de l'oléate d'éthyle après dérivation par la méthode des diméthyl disulfures</i>	155
<i>Figure 28: Quantités d'esters d'acides gras chez les nourrices et les butineuses</i>	157
<i>Figure 29 : Chromatogramme en phase gazeuse d'extraits totaux de 10 nourrices</i>	159
<i>Figure 30 : Chromatogramme en phase gazeuse d'extraits totaux de 10 butineuses</i>	159
<i>Figure 31 : Quantité d'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps d'abeilles butineuses</i>	162
<i>Figure 32 : Quantité d'oléate d'éthyle dans les différentes régions du corps de nourrices et de butineuses</i>	165
<i>Figure33 : Esters d'acides gras retrouvés dans le reste du tube digestif des nourrices</i>	170
<i>Figure 34 : Quantification de l'oléate d'éthyle dans le nectar et l'enveloppe du jabot de butineuses</i>	176
<i>Figure 35 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières A. m. ligustica prélevées à l'intérieur de la ruche</i>	179
<i>Figure 36 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières A. m. ligustica prélevées à l'intérieur de la ruche. Résultats par série</i>	180
<i>Figure 37 : Comparaison de la quantité d'oléate d'éthyle entre ouvrières ligustica de 28 jours prélevées à l'intérieur de la ruche et butineuses de 28 jours</i>	183
<i>Figure 38 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières A. m. mellifera prélevées à l'intérieur de la ruche</i>	186
<i>Figure 39 : Comparaison de la quantité d'oléate d'éthyle entre ouvrières mellifera de 28 jours prélevées à l'intérieur de la ruche et butineuses de 28 jours</i>	188
<i>Figure 40 : Comparaison de la quantité de l'oléate d'éthyle dans le jabot de mellifère et ligustica à 28 et 34 jours</i>	191
<i>Figure 41 : Effet de l'oléate d'éthyle sur l'âge au butinage</i>	196
<i>Figure 42 : Effet de l'oléate d'éthyle sur l'âge au butinage des abeilles</i>	197
<i>Figure 43 : Schéma hypothétique de la transmission de l'oléate d'éthyle par les butineuses, les larves et la reine aux ouvrières du nid</i>	212

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Ages (en jour) auxquels les tâches sont exécutées par les ouvrières</i>	30
<i>Tableau 2 : Développement de cinq paires de glandes chez l'ouvrière adultes</i>	36
<i>Tableau 3 : ANODEV pour MLG</i>	76
<i>Tableau 4 : Résultats des différences significatives de butinage entre deux races de jeunes abeilles du même âge</i>	78
<i>Tableau 5 : Résultats de ANOVA</i>	82
<i>Tableau 6 : Ethogramme des ouvrières placées en colonies double cohorte ou en colonie simple cohorte</i>	99
<i>Tableau 7 : Résultat du test de Fisher sur log (âge)</i>	117
<i>Tableau 8 : Comparaison de l'âge moyen au butinage entre les colonies traitées aux extraits de glandes mandibulaires et les témoins</i>	127
<i>Tableau 9 : Résultats du test de Friedman sur l'effet des extraits cuticulaires sur l'âge au butinage des abeilles</i>	135
<i>Tableau 10 : Résultats du test de Friedman sur l'effet des extraits céphaliques sur l'âge au butinage des abeilles</i>	139
<i>Tableau 11 : Esters méthyliques et éthyliques d'acides gras retrouvés chez les nourrices ou les butineuses</i>	158
<i>Tableau 12 : Quantités en ester d'acides gras chez les butineuses</i>	167
<i>Tableau 13 : Quantités en ester d'acides gras chez les nourrices</i>	168
<i>Tableau 14 : Esters présents dans le reste du tube digestif des nourrices</i>	170
<i>Tableau 15 : Quantification de l'oléate d'éthyle dans les pelotes de pollen de butineuses</i>	176
<i>Tableau 16 : Résultats du test de Fisher de comparaisons de chaque traitement 2 à 2 pour chaque série</i>	197

Introduction



Introduction

L'extraordinaire pouvoir d'adaptation de la colonie d'abeilles domestiques, *Apis mellifera* L., est dû à un système de régulation sociale très sophistiqué permettant d'ajuster à chaque instant les activités des ouvrières aux besoins de la société toute entière.

Le fonctionnement de la société réside notamment dans une répartition organisée du travail en fonction de l'âge des ouvrières. Ces dernières exécutent au cours de leur vie une séquence de comportements, depuis les travaux domestiques jusqu'aux activités de butinage. Cependant, ce développement comportemental des ouvrières fait preuve d'une grande flexibilité en fonction de l'état de la colonie et des aléas de l'environnement. Ainsi, il pourra être accéléré, ralenti et voire même inversé en réponse à des conditions particulières. Par exemple, dans une colonie sans ouvrières âgées, les jeunes abeilles partent butiner précocement (Nelson, 1927).

Plusieurs mécanismes interviennent dans la régulation du polyéthisme lié à l'âge. Ils peuvent être endogènes à l'abeille ou environnementaux. La communication chimique entre les membres de la colonie est importante pour permettre la régulation sociale. Deux phéromones modificatrices ont déjà été mises en évidence, la phéromone des glandes mandibulaires de la reine et la phéromone de couvain, elles ralentissent, toutes deux, le développement comportemental des ouvrières (Pankiw *et al.*, 1998 ; Le Conte *et al.*, 2001).

Ce même effet inhibiteur sur les jeunes ouvrières est également exercé par les butineuses âgées de la colonie (Huang et Robinson, 1992) et cette inhibition est provoquée par les interactions entre les ouvrières et non pas par des interactions entre les ouvrières et les réserves de la colonie (Schulz *et al.*, 1998). Ce phénomène, décrit dans le modèle de l'inhibition sociale (Beshers et Fewell, 2001), est connu depuis longtemps mais sa nature n'a pas encore été établie.

L'objectif de ma thèse a été d'identifier l'inhibiteur social. Pour cela, nous avons testé différentes hypothèses qui vont être exposées successivement dans ce mémoire.

Notre première approche a consisté à comparer trois races d'*Apis mellifera* L. (*ligustica*, *mellifera* et *caucasica*) afin de caractériser d'éventuelles différences d'inhibition sociale.

Notre démarche suivante a été de caractériser la nature du signal inhibiteur : est-il chimique et/ou comportemental ?

Nos résultats nous ont conduit à considérer la nature chimique de l'inhibiteur. Les molécules impliquées dans l'inhibition sont-elles volatiles ou transmises par contact ?

La réponse à cette question nous a conduit à identifier les molécules inhibitrices de contact. Pour cela, deux axes de recherche ont été entrepris.

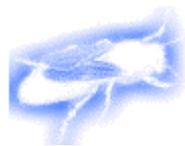
Le premier axe de recherche consiste à trouver un extrait actif de butineuses c'est-à-dire qui inhibe le développement comportemental de jeunes ouvrières. Les différentes fractions de cet extrait sont ensuite testées de la même façon sur le comportement. La fraction active retenue est alors analysée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) afin d'identifier les molécules responsables de l'inhibition.

Le second axe porte sur la comparaison des profils chimiques de nourrices et de butineuses afin de caractériser des molécules spécifiques en qualité ou en quantité de ces dernières. L'effet biologique de ces molécules est ensuite analysé sur le comportement.

Cette thèse s'est déroulée au sein du laboratoire de Biologie et Protection de l'Abeille, UMR 406, Ecologie des invertébrés, à l'INRA d'Avignon. Elle a été co-financée par le Département de Santé des Plantes et Environnement (SPE) de l'INRA et par l'Université de l'Illinois (Gene Robinson, Département d'Entomologie) sur des crédits de l'Institut National de la Santé (NIH) des Etats-Unis d'Amérique.

Partie 1

Apis mellifera L., un insecte eusocial :
le polyéthisme lié à l'âge et ses
mécanismes de régulation.



I. Le comportemental social et ses degrés de complexité

La vie sociale est apparue à de nombreuses reprises au cours de l'Évolution, dans l'ensemble du règne animal. Depuis les Invertébrés jusqu'aux Mammifères, elle revêt différentes formes et présente maints degrés de complexité. Le type d'organisation, les comportements qui mettent en place la vie en société et en assurent la pérennité, sont propres à chaque espèce au même titre que sa morphologie ou ses caractéristiques physiologiques. Il existe néanmoins des points communs entre les diverses modalités de vie sociale et leurs différents niveaux de complexité.

C'est dans le patrimoine génétique des Insectes que furent inscrites les formes les plus complexes d'organisation sociale: Hyménoptères et Isoptères possèdent les sociétés les plus accomplies. Parmi eux, les Abeilles.

Quels sont les traits communs aux diverses organisations sociales ? Et quels degrés de socialité caractérisent les nombreuses espèces d'abeilles ?

I.1. Définition de la société

Une société correspond à un groupe d'individus appartenant à la même espèce et organisés de manière coopérative grâce à une communication réciproque allant au delà de l'activité sexuelle (Wilson, 1975).

Le mot société pris dans son sens le plus strict n'englobe pas les espèces grégaires. En effet, dans une société, les interactions entre les individus produisent des effets qualitativement différents de la somme des activités individuelles. Si plusieurs organismes de la même espèce sont proches les uns des autres mais sans aucune influence réciproque alors on parlera d'agrégation et non pas de société (Michener, 1974).

Il n'en demeure pas moins que les agrégations, les simples comportements sexuels ou de territorialité sont des comportements importants des sociétés.

Il existe différents degrés d'organisation sociale, depuis les espèces présentant quelques caractères de socialité jusqu'aux sociétés les plus évoluées du règne animal qui sont nommées eusociétés ou sociétés vraies. Ces dernières sont définies par des critères précis :

- la présence d'individus sexués et stériles morphologiquement différents
- la coexistence d'au moins deux générations successives
- l'élevage en commun de la progéniture
- la division du travail (Michener, 1974).

Les eusociétés sont surtout représentées chez les insectes, chez les vertébrés, on observe ce type d'organisation sociale chez un mammifère seulement, le rat taupe glabre *Heterocephalus glaber* (Sherman et al, 1991 ; Burda et Kawalika, 1993). Les insectes sociaux les mieux connus regroupent deux ordres phylétiquement éloignés : les isoptères et les hyménoptères. Alors que chez les isoptères, seule la famille des termites est sociale, toutes les familles d'hyménoptères : fourmis, guêpes, abeilles regroupent des espèces sociales. Récemment, on a montré que certaines sociétés d'homoptères (Itô, 1989), de coléoptères (Kent et Simpson, 1992) et de thysanoptères (Crespi, 1992) ainsi que certaines araignées (Vollrath, 1986) répondent également à certains critères de l'eusocialité.

I.2. Degrés de socialité chez les Abeilles

Michener (1974) distingue différents degrés de socialisation chez les Abeilles.

Une abeille solitaire construit son propre nid et place dans les cellules assez de pollen et de nectar pour subvenir au bon développement de sa descendance. Elle n'est aidée d'aucune autre abeille et généralement meurt avant que sa progéniture n'atteigne le stade adulte. Il n'y a donc pas de contact entre les générations. C'est ce qui se passe, par exemple chez *Megachile rotundata*. Cependant chez certaines abeilles solitaires, la mère

s'occupe du nid et reste présente quand sa progéniture émerge, c'est le cas chez *Augochlora pura* (Stockhammer, 1966) ou chez beaucoup de *Xylocopa*. Mais la construction et l'approvisionnement des cellules réalisés par une seule abeille fondatrice constituent les caractéristiques majeures des abeilles solitaires.

Les espèces dont la femelle nourrit le couvain possèdent un degré de socialisation plus élevé. Plusieurs fondatrices peuvent se partager le même nid mais elles ne dépendent pas strictement les unes des autres car elles peuvent survivre séparément. Il s'agit des espèces **subsociales** telles que certaines *Megachiles* d'Afrique (Michener, 1968).

Chez les espèces **parasociales**, les femelles fondatrices coopèrent pour la construction des cellules. Chez les plus évoluées de ce groupe, les espèces **semisociales**, il existe un système de castes et de division du travail comme par exemple chez certaines espèces du genre *Pseudaugochloropsis* (Michener et Kerfoot, 1967).

Parmi les espèces **eusociales**, on distingue deux groupes. La plupart des bourdons, des Halictinae, des abeilles charpentières et leurs proches parents, les Xylocopinae, vivent dans de petites colonies, généralement fondées par une seule femelle qui travaille de façon solitaire effectuant tous les travaux nécessaires à la colonie : construction du nid, butinage, stockage de nourriture, ponte, élevage des larves. Plus tard, après l'émergence des abeilles filles, la vie sociale apparaît ; le travail est réparti entre la fondatrice (reine) et les ouvrières. Ce sont les colonies **eusociales inférieures**.

Seules les Meliponinae et les Apinae sont des abeilles **eusociales supérieures** (Michener, 1974). La colonie pérenne d'*Apis mellifera* L. est constituée d'une reine très différente, dans sa morphologie, son comportement et sa physiologie, des milliers d'ouvrières (filles stériles). Les individus vivent toujours en colonies et sont interdépendants, ne pouvant pas survivre s'ils sont isolés du reste du groupe. Les nouvelles colonies sont établies de façon sociale à partir d'un essaim.

I.3. Organisation sociale de la colonie d'*Apis mellifera*

L.

Comme nous venons de le voir, l'abeille domestique présente le degré le plus élevé d'organisation sociale.

Une société d'*Apis mellifera* L., qui compte environ 30 000 individus, regroupe trois types de membres rassemblés en deux castes.

Une caste est définie comme étant « un groupe d'individus de morphologie identique ou ayant le même âge, ou les deux, qui accomplit un travail spécifique, par exemple la reproduction, au sein de la colonie » (Wilson, 1971).

La reine et les mâles appartiennent à la caste des sexués (le mâle et la femelle étant considérés parfois dans la littérature comme appartenant à deux castes distinctes) qui prend en charge la fonction de reproduction.

La seconde caste est celle des ouvrières qui exécutent toutes les tâches nécessaires au fonctionnement de la colonie.

La reine, généralement unique dans la colonie, assure exclusivement la ponte et le maintien de la cohésion de la société.

Les autres membres sexués sont les mâles qui ne sont présents dans la colonie que durant les périodes où les ressources alimentaires sont importantes. Ils n'accomplissent qu'une seule fonction, la fécondation des reines, puis ils meurent.

Enfin, tous les autres individus de la colonie sont des femelles stériles appelées ouvrières. Pendant la période de pleine activité, au printemps dans nos régions tempérées, elles vivent en moyenne 6 semaines. Elles réalisent toutes les nombreuses tâches nécessaires à la vie de la colonie.

Un tel système ne pourrait pas fonctionner sans une réelle organisation de la société. Dans le chapitre suivant nous allons nous intéresser à cette répartition du travail au sein de la colonie et à sa régulation suivant les événements intérieurs et extérieurs au nid.

II. Le polyéthisme lié à l'âge chez *Apis mellifera* L.

Une eusociété comme celle des abeilles domestiques est non seulement fondée sur une spécialisation de certains individus dans la fonction de reproduction (seul un petit nombre y participe réellement) mais également sur une organisation complexe du travail entre les membres ouvriers.

La forme de division des tâches la plus spectaculaire s'appuie sur le polymorphisme des membres ouvriers. En fonction de sa morphologie, l'individu exécute une fonction particulière au sein de la colonie. Une telle répartition du travail existe chez quelques espèces de fourmis et chez presque toutes les espèces de termites (Hölldobler et Wilson, 1990 ; Noirot, 1989).

Dans les sociétés d'abeilles domestiques, le comportement et l'état physiologique de chacune des ouvrières changent en fonction de son âge. Ainsi à un instant donné un grand nombre d'activités est effectué dans la société. Cette division des tâches est nommée polyéthisme lié à l'âge.

Les recherches sur la division du travail chez l'abeille domestique sont anciennes et nombreuses et apportent une profusion de données. Deux techniques majeures ont été utilisées. Toutes deux supposent que les abeilles aient été préalablement marquées dès leur émergence au stade adulte ; ceci permet de suivre leurs activités comportementales dans une ruche souvent munie de parois vitrées. Alors que dans la première méthode, une seule abeille est suivie tout au long de sa vie, la seconde technique considère les diverses fonctions effectuées par un groupe d'abeilles du même âge.

II.1. Découverte de la base temporelle de la division du travail

Les premières études sur l'organisation du travail entre les abeilles de la colonie, soulignent déjà que les tâches sont réparties en fonction de l'âge : alors que les jeunes ouvrières accomplissent les activités à l'intérieur du nid, leurs sœurs plus âgées butinent (Butler C., 1609).

En 1855, Donhoff introduit une jeune reine fécondée de race *ligustica* dans une ruche orpheline d'abeilles de race *mellifera*. Il constate que les ouvrières *ligustica* issues de la nouvelle reine, ne partent pas butiner juste après leur émergence au stade adulte mais au bout de dix-neuf jours (Donhoff, 1855a, 1855b).

II.2. Description plus détaillée du polyéthisme lié à l'âge d'après Rösch

Il faut attendre les années 1925, 1930 pour que l'ordre chronologique et la nature des différents travaux soient établis. En effet, par la technique de marquage des ouvrières en fonction de leur âge, Rösch (1925, 1927 a, 1927 b, 1930) observe que les abeilles ne se spécialisent pas dans une fonction particulière mais que chacune exécute une séquence de tâches tout au long de sa vie. Ainsi après la mue imaginale, les abeilles nettoient les cellules puis entre le 3^{ème} et le 13^{ème} jours, elles deviennent nourrices. Entre 2 et 52 jours, elles construisent les rayons de cire, et les abeilles de 8 à 23 jours reçoivent le nectar des butineuses, tassent le pollen dans les cellules et enlèvent les débris dans la colonie. Peu avant de butiner, certaines abeilles deviennent des gardiennes. Les ouvrières partent butiner entre 10 et 34 jours et elles effectueront cette tâche jusqu'à la fin de leur vie.

II.3. Difficulté à établir un modèle de polyéthisme lié à l'âge

Décrire les bases de l'organisation du travail entre les abeilles paraît être une entreprise des plus difficiles et les auteurs n'arrivent pas tous aux mêmes conclusions.

Rösch lui-même (1925) met l'accent sur l'existence de grandes variations concernant l'âge auquel les différentes tâches sont exécutées.

D'autres études portant sur des colonies atypiques, anormalement privées de jeunes ou de vieilles ouvrières, démontrent que quel que soit l'âge des abeilles, ces dernières peuvent réaliser tous les travaux (Nelson, 1927 ; Himmer, 1930).

Cependant Perepelova (1928), Lindauer (1952), et Ribbands (1952) révèlent une diversité des comportements avant le butinage, chaque ouvrière passant rapidement d'une activité à une autre.

Après l'introduction dans une colonie typique d'abeilles marquées d'âge connu, Ribbands (1952) remarque qu'elles commencent à butiner entre 9 et 35 jours.

Le tableau 1 regroupe les données de plusieurs auteurs sur les âges auxquels les tâches sont effectuées par les ouvrières dans des colonies typiques (Michener, 1974). Il en ressort des différences frappantes selon les études. Ainsi, Lindauer trouve des limites d'âge pour certaines activités qui sont supérieures à celles obtenues par Rösch. Par exemple, selon Rösch les ouvrières s'occupent des larves de moins de 4 jours, entre le 3^{ème} et le 11^{ème} jour alors que pour Lindauer, cet intervalle se situe entre 2 et 28 jours. De plus, Rösch et Perepelova démontrent que les plus vieilles larves sont nourries par des ouvrières plus jeunes que celles qui soignent le jeune couvain. Pourtant Lindauer ne confirme pas cette conclusion.

Activité	Âges (jour)	Moyenne des âges (jour)	Références
Nourrissage des larves de moins de 4 jours	3-11	4.6	Rösch, 1925
	3-12	5.2	Perepelova, 1928
	2-28	11.5	Lindauer, 1952
Nourrissage des larves de plus de 4 jours	6-13	8.6	Rösch, 1925
	6-16	9.2	Perepelova, 1928
	2-26	12.8	Lindauer, 1952
Réception du nectar	8-14	11.2	Rösch, 1925, 1927
Enlever les débris de la ruche	10-23	14.7	Rösch 1925, 1927
	2-20	13.9	Perepelova, 1928
Egaliser les bords des cellules	2-20	8.7	Perepelova, 1928
Construction des rayons	2-52	15.8	Rösch 1925, 1927
Premier voyage de butinage	10-34	19.5	Ribbands, 1952
	10-32	20.1	Ribbands, 1952
	9-35	19.2	Ribbands, 1952
	20-41	30.2	Lindauer, 1952
	5-39	18.3	Sakagami, 1953

Tableau 1 : Âges (en jour) auxquels les tâches sont exécutées par les ouvrières.

D'après Michener, 1974.

Par conséquent, des activités différentes exécutées au même âge par des individus différents sont observées dans des colonies différentes ou au sein d'une même société à diverses périodes de l'année (Michener, 1974).

II.4. les facteurs de variations

Comment expliquer cette difficulté à établir un modèle unique de division du travail entre les ouvrières ?

Les résultats différents obtenus par les auteurs peuvent tout d'abord s'expliquer par des techniques d'observation des abeilles qui varient. Par exemple, les définitions des tâches, les lieux et les époques d'analyses diffèrent entre les auteurs (Michener, 1974).

De plus, toutes les ouvrières ne suivent pas la même séquence comportementale au cours de leur vie. Nolan en 1924 constate que la répartition des tâches se fait en fonction de l'âge des abeilles mais il remarque que « le fait que chaque ouvrière suit les étapes du polyéthisme lié à l'âge sans en omettre certaines n'a pas été prouvé ». Lindauer (1952) observe que la plupart des abeilles (136 sur 159) ne deviennent jamais gardiennes. Afin d'expliquer pourquoi les ouvrières commencent leur butinage entre 9 et 35 jours, Ribbands (1952) suppose que certaines ouvrières écourteraient voire omettraient certaines tâches.

Une autre source importante de variabilité consiste pour l'ouvrière à exécuter plusieurs tâches le même jour. Lindauer (1952) observe une abeille âgée de 8 jours pendant 10 heures successives. Il note que cette dernière passe son temps à se reposer, à patrouiller, à manger du pollen, à nettoyer des cellules, à s'occuper du couvain, à construire et operculer des cellules.

Sakagami (1953) examine le comportement de groupes d'abeilles d'âge connu et il suit également certains individus continuellement pendant de longues périodes. Les abeilles

réalisent deux ou trois activités en un jour et il relève de grandes variabilités dans l'âge d'exécution des tâches. Mais en général, ces observations corroborent celles de Rösch. Au cours de sa vie, chaque ouvrière accomplit successivement 4 séries de travaux : nettoyage des cellules (étape 1), construction des rayons et nourrissage des larves (étape 2), réception du nectar et tassement du pollen auxquels s'ajoutent encore la construction et le nettoyage des cellules, l'évacuation des débris et la défense du nid (étape 3). Enfin, le butinage constitue la dernière étape (4). Selon l'auteur les vols d'orientation apparaissent habituellement lors de l'étape 2 ou 3. Souvent, certaines ouvrières écourtent voire sautent certaines tâches de l'étape 3.

La grande variabilité dans les âges s'explique aussi par l'existence d'une spécialisation chez certaines ouvrières. En effet, occasionnellement une ouvrière n'exécutera qu'une seule tâche pendant une grande partie de sa vie. Robinson *et al.* (1984) ont observé une abeille qui passa les quatorze derniers jours de sa vie à récolter de l'eau. Seulement une faible proportion se spécialise dans l'élimination des cadavres d'abeilles à l'intérieur du nid (Sakagami, 1953 ; Visscher, 1983) ou dans la fonction de gardienne (Lindauer, 1952 Moore et al., 1987). Toutefois une ouvrière est rarement aussi spécialisée, elle réalisera environ vingt tâches au cours de sa vie (Kolmes, 1985b).

Cette diversité des âges auxquels les tâches sont effectuées semble montrer que l'âge ne serait pas le seul facteur déterminant l'activité à effectuer. Ribbands (1952) souligne en effet la relation entre le comportement de l'ouvrière et les besoins de la colonie : « les travaux exécutés par chaque ouvrière sont la résultante des besoins de la colonie et de l'âge de l'individu ».

II.5. recherches récentes sur la division du travail

Au cours de chaque étape comportementale, une ouvrière appartient à un groupe d'individus d'âge à peu près similaire qui exécute une même tâche, on dit qu'elle fait partie d'une « caste d'âge » particulière. Seeley (1982) résume la division du travail chez l'abeille

comme étant constituée de quatre castes d'âges : nettoyage des cellules, soin au couvain, stockage de la nourriture, enfin butinage. A l'inverse, les expériences de Kolmes (1985a, b, 1986) montrent que les ouvrières ne semblent pas présenter de division rigoureuse du travail avant le butinage : « les résultats sur les subdivisions temporelles du comportement entre les ouvrières du nid, mentionnés dans la littérature, sont très variables en fonction des conditions expérimentales. ». Mais un travail en collaboration entre les deux chercheurs (Seeley et Kolmes, 1991) conclut que le polyéthisme d'âge entre les ouvrières du nid existe. En effet les ouvrières passeraient par une, voire deux transitions statistiquement significatives dans le nid avant de devenir butineuses. Les données présentées par Robinson (1987a) révèlent bien la présence d'étapes comportementales des ouvrières à l'intérieur du nid mais ne confirment pas les subdivisions en trois castes d'âge proposées par Seeley (1982).

Enfin, le modèle typique qui en ressort est le suivant : très tôt après l'émergence, l'ouvrière réalise les travaux d'intérieur. Elle entreprend ainsi le nettoyage des cellules, les soins au couvain et à la reine, puis elle reçoit le nectar, tasse le pollen, elle construit les rayons et nettoie la ruche. C'est au cours des trois premières semaines de sa vie que la jeune abeille réalise ces travaux mais au cours de cette période elle sort parfois de la ruche pour effectuer de courts vols d'orientation. Ces activités à l'intérieur de la colonie sont suivies par des travaux d'extérieur : la ventilation, la garde et finalement les voyages de butinage que l'abeille effectue pendant le reste de son existence (Winston, 1987) (voir figure 1).

Winston (1987) regroupe donc l'exécution des divers travaux en quatre phases bien distinctes se chevauchant dans le temps : le nettoyage des cellules et l'operculation, les soins au couvain et à la reine, la construction des rayons et la manipulation de nourriture et enfin la garde et le butinage. Alors que les deux phases intermédiaires montrent le plus grand chevauchement de travaux, les jeunes nettoyeuses de cellules du premier groupe et les vieilles butineuses du dernier groupe ont tendance à se spécialiser dans leur tâche et sont donc les plus facilement discernables.

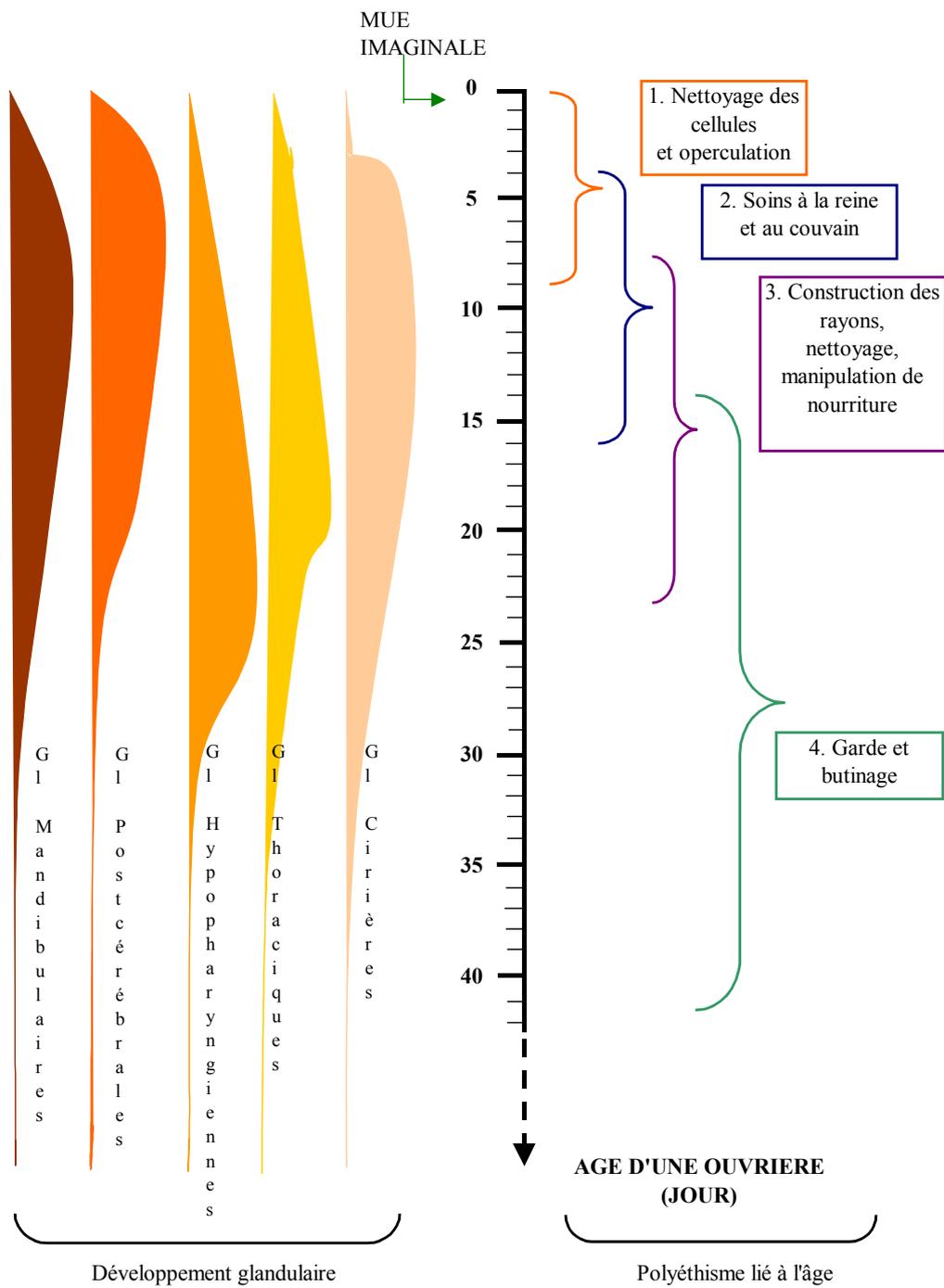


Figure 1 : Polyéthisme lié à l'âge et développement glandulaire

Adapté de Michener, 1974.

II.6. La base physiologique de la division du travail

L'état physiologique des ouvrières est étroitement lié à l'accomplissement des travaux. En effet, le développement et la régression de certaines glandes au cours du temps s'accompagnent d'une modification du comportement de l'abeille. En 1933, King décrit l'évolution de cinq paires de glandes en fonction de l'âge des ouvrières : les glandes mandibulaires, les glandes hypopharyngiennes, les glandes protocérébrales, les glandes thoraciques et les glandes cirières. Il souligne que « chacun de ces cinq systèmes glandulaires se modifie au cours de la vie de l'ouvrière ; il passe par une première phase de croissance jusqu'à atteindre un pic puis diminue progressivement » (voir figure 1).

Le tableau 2 indique les âges moyens auxquels les glandes sont le plus développées, en prenant en compte les âges extrêmes observés.

Par exemple, les glandes hypopharyngiennes, situées dans la tête, synthétisent et sécrètent des lipides, des protéines et des vitamines contenus dans la nourriture larvaire (Patel *et al.*, 1960). Alors que chez les jeunes abeilles nourrices ces glandes sont bien développées, elles sont atrophiées chez les butineuses, chez lesquelles elles produisent de l' α -glucosidase, une enzyme impliquée dans la transformation du nectar en miel (Simpson *et al.*, 1968).

	Age moyen de développement maximum (jour)	Intervalle de développement (jour)	Fonction
Glandes mandibulaires	12	4-14	Production de l'acide-10-hydroxy-2-décénoïque (10-HDA), de l'acide 10-hydroxydécanoïque (10-HDAA) et de l'acide octanoïque (Butenandt et Rembold, 1957) substance d'alarme : 2-heptanone (Shearer et Boch, 1965)
Glandes hypopharyngiennes	12	4-18	jeunes ouvrières : nourriture larvaire (protéines, lipides et vitamines) (Patel <i>et al.</i> , 1960) ouvrières âgées : invertase (Maurizio, 1962 ; Simpson <i>et al.</i> , 1968)
Glandes cirières	13	9-19	Production de cire (Dreyling, 1903 ; Rösch, 1927)
Glandes labiales céphaliques	27	12-27	Sécrétion huileuse (Arnold et Delage-Darchen, 1978) Changement de composition en fonction de l'âge (Katzav-Gozansky, 1999)
Glandes labiales thoraciques	19	10-19	Sécrétion aqueuse qui dissout les sucres (Simpson, 1960)

Tableau 2 : Développement de cinq paires de glandes chez l'ouvrière adulte.

III. Flexibilité du développement comportemental

Même si les ouvrières suivent un développement comportemental qui les conduit à exécuter des tâches précises au cours de leur vie, on peut noter une grande variabilité de ce polyéthisme lié à l'âge. Dans le chapitre précédent, la difficulté d'établir un modèle typique de polyéthisme lié à l'âge entre les ouvrières a été soulignée. Elle s'explique par la grande variabilité des âges auxquels les travaux sont effectués et aussi par le fait que toutes les ouvrières ne suivent pas la même séquence comportementale au cours de leur vie, certaines omettant des tâches, d'autres se spécialisant dans un travail. Mais les ouvrières présentent aussi une grande flexibilité dans leur développement comportemental pour ajuster parfaitement leur travail aux besoins de la colonie.

Les sociétés d'abeilles sont des entités biologiques dynamiques. Au cours du temps, la taille et la structure de la société changent. Ces changements sont associés :

- aux développement de la colonie
- à la saison
- à la disponibilité de la nourriture
- à la pression de prédation
- aux conditions climatiques (Oster et Wilson, 1978).

A côté du modèle typique du polyéthisme lié à l'âge, suivant lequel les jeunes ouvrières exécutent les travaux d'intérieur pendant que les plus vieilles butinent, les individus de la colonie peuvent accélérer, retarder et même inverser leur développement comportemental en réponse à des changements de conditions externes et internes à la société ; ce qui conduit à l'accomplissement des travaux à des âges atypiques (voir figure 2).

Il existe également des modifications à court-terme des âges auxquels les tâches sont effectuées. Ainsi, les ouvrières changent de niveau d'activité en réponse aux altérations de la structure d'âge de la colonie (Kolmes et Winston, 1988) ou bien elles

peuvent passer d'un état actif à un état inactif en fonction de la quantité de travail demandée dans certaines tâches (Breed et *al.*, 1990).

III.1. Accélération, ralentissement du développement comportemental

Après une prédation, un essaimage ou une maladie, une grande partie des butineuses peut être supprimée et la colonie se retrouve alors avec une majorité de jeunes ouvrières. Ces dernières sont capables de raccourcir leur période d'activité à l'intérieur du nid et deviennent des butineuses précoces (Winston et Fergusson, 1985). Les ouvrières (dont la durée de vie pendant la saison d'activité est de 5 à 8 semaines) qui se retrouvent dans de telles conditions deviennent butineuses à environ 7 jours, c'est-à-dire deux semaines plus tôt que l'âge normal de début du butinage (Free, 1979). C'est ce qui se passe également dans le cas d'une forte augmentation des naissances si les conditions en fin de printemps sont particulièrement favorables. Pour compenser l'insuffisance de butineuses et donc le manque de ressource pour nourrir la population grandissante, les jeunes ouvrières peuvent partir butiner précocement (Oster et Wilson, 1978).

Cette précocité au butinage peut être aussi provoquée par des conditions expérimentales précises. Nelson (1927) examine le développement comportemental de jeunes ouvrières placées dans des ruchettes contenant un nourrisseur avec une reine mais sans abeilles âgées. Il observe que les abeilles récoltent du nectar au bout du sixième jour et il conclut « que les jeunes abeilles sont capables de réaliser toutes les tâches à l'intérieur de la colonie (...) elles partent butiner plus tôt que la normale alors que la ruche contient un abreuvoir rempli de sirop » (Nelson, 1927). D'autres expériences utilisant des colonies constituées de 2000 abeilles âgées de 1 à 3 jours démontrent qu'au bout d'une semaine de vie adulte, certaines ouvrières s'occupent du couvain alors que d'autres butinent précocement (Robinson et *al.*, 1989).

Un ralentissement du développement comportemental des ouvrières apparaît dans des colonies qui possèdent une population âgée. Il conduit à l'apparition d'individus qui continuent à s'occuper du couvain et de la reine malgré leur âge avancé. C'est ce qui se produit lors de l'essaimage : la nouvelle colonie issue de l'essaim est constituée d'une majorité d'abeilles âgées car les premières émergences d'ouvrières ne se produisent qu'au bout de trois semaines après la ponte. Le besoin en nourrices de la colonie retarde le développement des ouvrières les plus jeunes qui restent à ce stade plus longtemps (Robinson *et al.*, 1989 ; Naumann et Winston, 1990).

Un développement comportemental retardé peut aussi être provoqué artificiellement avec des colonies formées uniquement d'abeilles âgées (Rösch, 1930). Milojevic (1940) force des ouvrières à rester nourrices pendant 75 jours et à cet âge 88.7% d'entre elles ont leurs glandes hypopharyngiennes encore pleinement développées, taille de glandes qui est observée normalement chez des abeilles plus jeunes.

III.2. Réversibilité du développement comportemental

La réversibilité du développement comportemental (retour de certaines butineuses vers un comportement de nourrice) a été observée dans des colonies expérimentales privées de jeunes abeilles (Rösch, 1930 ; Page *et al.* ; 1992 ; Robinson *et al.*, 1992). L'absence de jeunes ouvrières pour effectuer les travaux à l'intérieur du nid entraîne chez les abeilles plus âgées la régénération des glandes produisant la gelée royale et des glandes cirières. Ces changements physiologiques permettent aux abeilles de réaliser à nouveau les travaux de nourrissage du couvain et de construction des rayons. Le contexte naturel qui induirait un tel changement est mal connu. On peut supposer par exemple, que les abeilles qui émergent à la fin de l'automne ont le temps de se développer jusqu'au stade de butineuse mais n'ont pas le temps de sortir butiner avant l'hiver. Ces butineuses potentielles, qui ne peuvent pas sortir, effectueraient des travaux d'intérieur tels que la régulation de la température ou les soins au couvain (Robinson, 1992).

Donc la répartition du travail entre les ouvrières peut être considérée comme un système flexible dans lequel les abeilles passent en règle générale des tâches domestiques aux travaux d'extérieur, mais la vitesse et même le sens de cette évolution s'adaptent aux conditions de la colonie et de l'environnement extérieur.

Des recherches intégrant des aspects de biologie du comportement, d'endocrinologie, de neurobiologie et de génétique ont été conduites pour comprendre la régulation de la division temporelle du travail (Robinson, 1992 ; Huang et Robinson, 1992 ; Giray et Robinson, 1994 et 1996 ; Huang et Robinson, 1996 , Huang et *al.*, 1998). Elles portent essentiellement sur l'âge auquel les ouvrières vont butiner car le passage au butinage constitue la transition la plus brutale et donc la plus facilement observable au cours du développement.

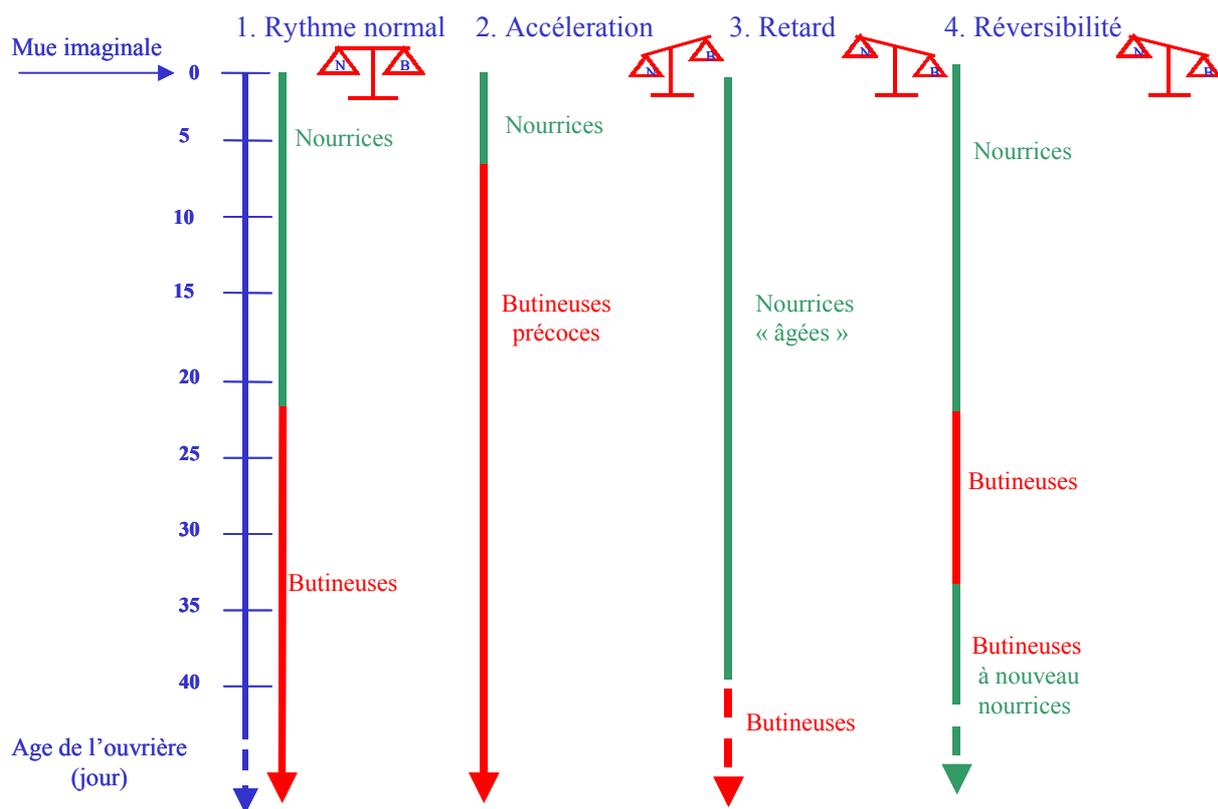


Figure 2 : Flexibilité du développement comportemental de l'ouvrière
 N= nourrices B=butineuses

IV. Mécanismes de régulation du polyéthisme lié à l'âge

Le développement comportemental de chaque ouvrière met en jeu de nombreux mécanismes. Loin d'être tous définis, ils témoignent cependant du haut degré de régulation du développement des ouvrières et par là même des remarquables facultés d'adaptation de la colonie toute entière.

Au niveau de l'individu les facteurs sont d'ordre endocrinien, génétique, neurologiques ou moléculaires. Mais il existe également des facteurs externes aux organismes et liés à la colonie dans son ensemble qui affectent la régulation de la division du travail.

IV.1. Les mécanismes endogènes

IV.1.1. Contrôle hormonal : l'hormone juvénile (HJ)

L'hormone juvénile est un sesquiterpène produit par les *corpora allata*, glandes situées dans la tête, adjacentes à l'œsophage à l'endroit où ce dernier passe entre le cerveau et le ganglion sous-oesophagien (dans Fahrbach, S.E et Robinson, G.E., 1996 ; Hartfelder, 2000). Cette hormone joue un rôle fondamental dans le développement larvaire des insectes, notamment chez *Apis mellifera* L. : la présence de l'HJ dans l'hémolymphe de la larve empêche la mue imaginale de se produire précocement sous l'influence activatrice d'une seconde hormone, l'edysone (Riddiford, 1985).

Parmi, les différents types d'hormone juvénile présents chez les insectes, *Apis mellifera* L. possède une seule forme, qui est la plus répandue, l'HJ de type III (dans Hartfelder, 2000). La quantité de cette hormone dans l'hémolymphe de l'ouvrière augmente avec l'âge depuis environ 0.05 pmol/ μ l au premier jour de vie adulte jusqu'à plus de 0.2 pmol/ μ l au bout de trois semaines (Fluri *et al.*, 1982 ; Robinson *et al.*, 1987).

L'évolution du taux d'hormone juvénile est étroitement corrélée au développement comportemental des ouvrières, la quantité augmentant avec l'âge de l'ouvrière (Fluri *et al.*, 1982 et Robinson *et al.*, 1989). Les taux bas sont associés aux travaux effectués à l'intérieur du nid comme la fonction de nourrice alors que les taux élevés atteints au bout de trois semaines correspondent au début du butinage. Les abeilles traitées avec de l'HJ (Jaycox, 1976), avec un mimétique de HJ (Jaycox *et al.*, 1974) ou avec un composé analogue comme le méthoprène présentent un butinage précoce (Robinson, 1985, 1987a, b ; Robinson et Ratnieks, 1987 ; Sasagawa *et al.*, 1989). Toutefois, l'intensité du butinage ne semble en rien affectée par le traitement (Robinson, 1985), ce qui laisse donc supposer que l'HJ n'agit que sur la durée du développement comportemental de l'ouvrière (Robinson, 1992) et non sur le comportement de butinage lui-même. De plus, de fortes doses de méthoprène administrées aux ouvrières ne modifient pas seulement l'âge au butinage mais toute la séquence comportementale, preuve que l'HJ serait impliquée dans la régulation du polyéthisme lié à l'âge tout au long de la vie des abeilles (Robinson, 1987).

L'HJ coordonne le développement comportemental et physiologique chez les abeilles induisant le développement de certaines glandes spécifiques de certaines tâches. Comme mentionné précédemment, les nourrices possèdent des glandes hypopharyngiennes développées qui permettent l'alimentation larvaire. Des traitements avec de l'HJ chez les nourrices provoquent la dégénérescence prématurée de ces glandes, un phénomène qui accompagne normalement chez l'ouvrière le passage des tâches d'intérieur vers le butinage (Rutz *et al.*, 1976 ; Bestma et Ten Houten, 1974 ; Jaycox *et al.*, 1974 ; Jaycox, 1976, Sasagawa *et al.*, 1989). De la même façon, un traitement au méthoprène induit chez l'ouvrière la production précoce de deux phéromones d'alarme : la 2-heptanone et l'isopentyl acétate, normalement sécrétées par les abeilles âgées (Robinson, 1985).

Les résultats de certaines expériences soulignent que l'HJ est impliquée dans la flexibilité du développement comportemental. Par exemple, les butineuses précoces d'une colonie déficitaire en butineuses d'âge typique présentent des taux de HJ élevés, comparables à ceux des butineuses plus âgées (Robinson *et al.*, 1989 ; Huang et Robinson, 1992). De la même façon, les nourrices « âgées » d'une colonie, dans laquelle il manque des

jeunes abeilles, gardent des seuils bas de HJ identiques à ceux des nourrices d'âge normal (Robinson *et al.*, 1989).

De plus, chez les ouvrières qui ont régressé du stade de butineuse à celui de nourrice, les taux de HJ redeviennent faibles, correspondant ainsi à des quantités trouvées chez des jeunes nourrices (Robinson *et al.*, 1992 ; Huang et Robinson, 1996).

Cependant, l'hormone juvénile n'est pas indispensable pour réguler le développement comportemental des ouvrières de la colonie. En effet, les travaux de Sullivan *et al.* (2000) montrent que l'ablation des *corpora allata* n'empêche pas les abeilles de devenir butineuses même si cette opération retarde quelque peu le développement. Mais cette étude indique surtout que les abeilles privées de leurs *corpora allata* butinent plus précocement lorsqu'elles sont placées dans des colonies jeunes constituées de 1500 abeilles qui viennent toutes d'émerger au stade adulte (« colonies à cohorte simple »). Par conséquent, l'absence des glandes productrices de l'HJ n'empêche pas l'accélération du développement lorsque les abeilles sont placées dans des conditions de stress favorisant ce phénomène. Une autre preuve que l'HJ n'est pas nécessaire au butinage a été donnée par Huang et Robinson (1985) : les butineuses d'hiver en activité possèdent des quantités faibles de HJ par rapport aux butineuses actives du printemps. Enfin, la phéromone de couvain ralentit le développement comportemental des ouvrières mais ne diminue pas le taux de HJ des abeilles d'automne. L'hormone juvénile dont le taux varie en fonction des saisons n'est donc pas directement corrélée au développement comportemental (Le Conte *et al.*, 2001).

IV.1.2. Les facteurs génétiques

La structure génétique d'une colonie d'abeilles *Apis mellifera* L. est complexe car la reine s'accouple avec sept à dix-sept mâles lors du vol nuptial et le sperme est brassé dans la spermathèque. Il en résulte une grande variabilité génétique au sein même de la colonie, composée de plusieurs sous-familles d'ouvrières, groupes d'abeilles issues du même mâle (Page, 1986 ; Page et Laidlaw, 1988).

Des différences de comportements entre différentes sous-familles d'abeilles d'une même colonie ont été mises en évidence. Par exemple, des ouvrières d'une sous-famille donnée deviennent gardiennes, alors qu'au même âge, d'autres abeilles d'une sous-famille différente sont plus aptes à s'occuper du rejet des cadavres à l'extérieur de la colonie. De même, selon leur génotype, les butineuses récolteront préférentiellement du pollen ou du nectar (Free, 1965 ; Sekiguchi et Sakagami, 1966 ; Moore *et al.*, 1987 ; Robinson et Page, 1988 ; 1989).

Afin de connaître les effets de l'environnement et ceux du génotype sur le comportement des abeilles, une autre méthode consiste à comparer le comportement d'ouvrières de lignées différentes naturelles ou sélectionnées qui ont été élevées ensemble ou séparément. Deux lignées d'ouvrières ont été sélectionnées sur leur aptitude à stocker des quantités importantes, ou au contraire faibles, de pollen. Si les deux lignées sont élevées dans la même ruche, les différences de stockage de pollen persistent et d'autres distinctions dans l'exécution de certains travaux d'intérieur apparaissent comme la ventilation, le lissage des opercules ou les soins au couvain (Calderone et Page, 1988). Cette étude montre bien que les facteurs génétiques agissent sur la division des tâches entre les abeilles, et ce indépendamment des facteurs environnementaux.

Les caractéristiques génétiques des ouvrières d'une colonie influencent non seulement la réalisation de tel ou tel travail à un âge donné mais elles interviennent aussi dans le rythme de développement comportemental des individus. Ainsi, au sein de la société, des ouvrières présentent un développement rapide alors que d'autres partent butiner plus tard (Calderone et Page, 1988 ; 1992). Des comparaisons entre différentes races d'*Apis mellifera* L. montrent également des différences de rythme de développement comportemental. Ainsi, l'abeille africanisée, *Apis mellifera scutellata* commence à butiner plus tôt que l'abeille européenne, *Apis mellifera ligustica* (Winston et Katz, 1982).

Cependant, *Apis mellifera ligustica* se révèle plus précoce que deux autres races européennes, *A. m. caucasica* et *A. m. mellifera* (Brillet *et al.*, 2002).

Les composantes génétiques dans la flexibilité du polyéthisme lié à l'âge semblent surtout déterminer la vitesse à laquelle l'individu se développe. Les abeilles dont le génotype présente un rythme de développement comportemental rapide dans des conditions normales, sont susceptibles de montrer un butinage précoce en conditions de stress, c'est-à-dire en l'absence d'abeilles en âge d'aller butiner. De la même façon, ce sont les ouvrières ayant un génotype correspondant à un développement comportemental plus lent qui resteront nourrices plus longtemps en l'absence de nourrices d'âge normal (Giray et Robinson, 1994). En effet, dans une colonie expérimentale constituée uniquement de 1500 abeilles qui viennent à peine d'émerger au stade adulte, certaines sous-familles d'ouvrières sont susceptibles de devenir des butineuses précoces par rapport aux autres sous-familles de la colonie (Robinson *et al.*, 1989 ; Page *et al.*, 1992). Mais au même âge, les ouvrières d'autres sous-familles ont plus de chance de rester nourrices malgré leur âge avancé (Robinson *et al.*, 1989).

Giray *et al.* (1999) ont montré que les différences génétiques entre ouvrières impliquées dans la répartition des tâches sont associées à plusieurs facteurs physiologiques qui influencent le développement comportemental des individus : la production de HJ et la sensibilité des abeilles à cette hormone, l'effet inhibiteur des ouvrières âgées sur les plus jeunes de la colonie (voir chapitre V) et la sensibilité de ces jeunes abeilles à ce même pouvoir inhibiteur.

IV.1.3. Les facteurs neurobiologiques

Des modifications de la structure cérébrale sont associées au développement comportemental de l'ouvrière. Deux régions sont concernées : les corps pédonculés et les lobes antennaires. Le volume du neuropile des corps pédonculés augmente avec l'âge de l'abeille, il est beaucoup plus développé chez les butineuses (Withers *et al.*, 1993) et ce même changement apparaît chez des butineuses précoces (Withers *et al.*, 1993, 1995 ; Durst *et al.*, 1994 ; Fahrbach et Robinson, 1996). De récents travaux montrent que les lobes antennaires des butineuses renferment des taux élevés d'un neuromodulateur,

l'octopamine, présent en moindre quantité chez les nourrices (Wagener-Hulme et al., 1999). Ce dernier serait impliqué dans la régulation du développement comportemental car des butineuses précoces possèdent autant d'octopamine que des butineuses d'âge normal (Schulz et Robinson, 1999). D'autres résultats viennent renforcer cette hypothèse : l'administration orale d'octopamine à de jeunes abeilles provoque une augmentation du niveau d'octopamine dans le cerveau de ces abeilles qui présentent un butinage précoce (Schulz et Robinson, 2001). En revanche, on se demande si la voie nerveuse empruntée par l'octopamine encore inconnue serait similaire à celle de l'HJ ?

D'autres travaux montrent que des changements de rythmes biologiques apparaissent au cours du développement comportemental de l'ouvrière. Alors que les jeunes abeilles accomplissent les tâches d'intérieur de façon arythmique, les butineuses suivent un rythme circadien lors du butinage, pour accomplir les danses de communication et pour optimiser la période de ressources maximales en pollen et en nectar (von Frisch, 1967 ; Moore et al., 1998). Juste avant de devenir butineuses, les abeilles présentent un rythme circadien et celles qui possèdent un « géotype précoce » c'est-à-dire celles qui iront butiner plus tôt que les autres ouvrières, montrent également une précocité dans l'apparition de ce rythme.

Ces changements de rythmicité sont aussi liés à des modifications de l'expression d'un gène, nommé gène « période ». Le niveau d'expression du gène est plus élevé dans les cerveaux de butineuses que dans ceux des abeilles plus jeunes mais on retrouve une forte expression de ce gène chez des butineuses précoces, ce qui suggère son implication dans la plasticité du développement comportemental des ouvrières (Toma *et al.*, 2000).

De plus, le passage des tâches d'intérieur vers le butinage est associé à l'augmentation de l'expression d'un autre gène, nommé gène de « butinage » codant pour une protéine : la 3'4' monophosphate guanosine (cMPG)-protéine kinase dépendante. Des abeilles émergentes traitées avec de la cMPG présentent une activité élevée de la protéine kinase, similaire à celle des butineuses, et partent butiner précocement (Ben-Shahar *et al.*, 2002).

A côté de ces divers facteurs endogènes, il existe des paramètres extérieurs qui agissent également sur la régulation du développement comportemental de l'individu pour adapter ses activités à l'état de la colonie.

IV.2. Les mécanismes exogènes

La régulation de la division du travail entre les ouvrières est un véritable puzzle car dans une société qui compte environ 50 000 individus, il est peu probable que chaque membre puisse percevoir l'état de la colonie toute entière afin d'ajuster son travail aux besoins. Il n'y a également aucune preuve de la présence d'un système de contrôle centralisé dans lequel quelques individus percevraient l'ensemble des besoins de la colonie et inciteraient les ouvrières à changer de travail (Wilson et Hölldobler, 1988). Cependant, de nombreux facteurs externes à l'individu et propres à la colonie tels que la communication chimique ou l'influence des ouvrières âgées sur les plus jeunes, interviennent dans la régulation du développement comportemental des abeilles de la société.

IV.2.1. La communication chimique

Selon Wilson (1971), la communication correspond à " l'émission par un individu d'un stimulus qui provoque une réaction chez un autre individu, la réaction étant bénéfique à celui qui émet le stimulus, à celui qui le reçoit ou aux deux ". Ces stimuli peuvent être de nature chimique (olfactif, gustatif), mécanique (tactile, auditif), agir par radiation (perception de la lumière, vision) ou dans de plus rares cas, être de nature électrique (électro-sensibilité chez certains poissons, Lissman, 1963).

Chez les insectes sociaux, la communication chimique est un système très développé, basé sur la production de phéromones, substances chimiques émises par un

individu et qui déclenchent chez un congénère une modification de son comportement ou de sa physiologie (Karlson et Lüscher, 1959).

Notre connaissance des phéromones a considérablement progressé depuis les années soixante avec l'arrivée d'instruments capables d'identifier ces molécules (chromatographie couplée à la spectrométrie de masse) à des doses infimes, à l'échelle d'un seul insecte, et avec la mise en place de tests comportementaux pour caractériser le rôle biologique de ces substances. En fonction de leur action, les phéromones se divisent en deux catégories :

- les phéromones incitatrices qui agissent directement sur le comportement du congénère qui les reçoit
- les phéromones modificatrices qui exercent une action à long terme sur la physiologie de l'individu récepteur (Wilson, 1962).

Dans le monde confiné de la ruche aussi bien qu'à l'extérieur, les abeilles ont développé un langage phéromonal des plus complexes. Les phéromones permettent la réalisation de nombreuses tâches comme les soins au couvain (Huang *et al.*, 1989 ; Le Conte *et al.*, 1990), et à la reine (Winston et Slessor, 1992) ou la défense du nid (Collins *et al.*, 1980).

Deux phéromones modificatrices ont déjà été identifiées comme jouant un rôle dans la plasticité du polyéthisme lié à l'âge : la phéromone des glandes mandibulaires de la reine et la phéromone de couvain.

La phéromone des glandes mandibulaires de la reine (PGMR)

La phéromone émise par les glandes mandibulaires de la reine est un mélange complexe de molécules parmi lesquelles 5 ont été démontrées comme suffisantes pour reproduire le comportement de cour des ouvrières. Cette phéromone est composée de trois acides gras :

- **Acide 9-oxo-(E)-2-décénoïque (9-ODA)** (Barbier et Lederer, 1960 ; Callow et Johnston, 1960)
- **acide (R)-9-hydroxy-2(E)-décénoïque (R-9-HDA)** (Butler et Fairey, 1964 ; Callow *et al.*, 1964)

- **acide (S)-9-hydroxy-2(E)-décénoïque (S-9-HAD)**

et deux composés aromatiques :

- **parahydroxybenzoate de méthyle (HOB)**
- **4-hydroxy-3-méthoxyphényléthanol (HVA)** (Slessor *et al.*, 1988 ; Kaminski *et al.*, 1990).

Récemment, quatre nouvelles substances ont été identifiées dans les glandes mandibulaires de la reine. Elles interviennent également dans l'effet incitateur du comportement de cour des ouvrières (Keeling, 2001). Ce sont :

- **oléate de méthyle**
- **l'alcool coniferylique**
- **1-hexadécanol**
- **l'acide linoléique (LEA)**

Cette phéromone possède plusieurs effets incitateurs. Elle agit notamment sur le comportement de cour des abeilles qui nourrissent, nettoient et touchent la reine avec leur antennes véhiculant ainsi la substance royale à travers toute la colonie (Slessor *et al.*, 1988 ; Kaminski *et al.*, 1990). Elle inhibe l'élevage de nouvelles reines par les ouvrières (Winston *et al.*, 1990 ; Pettis *et al.*, 1995 ; Melathopoulos *et al.*, 1996), attire les ouvrières dans l'essaim (Winston *et al.*, 1989), stimule le butinage de pollen et l'élevage de couvain dans de petites colonies nouvellement fondées (Higo *et al.*, 1992) et elle stimule la construction des cellules du nid (Ledoux *et al.*, 2001).

La PGMR possède également un rôle de phéromone modificatrice en agissant sur la physiologie des ouvrières. Non seulement, elle semble inhiber le développement ovarien des ouvrières (Jay, 1970 ; Willis *et al.*, 1990 ; Lin, 1999) mais elle régule aussi le développement comportemental des ouvrières. En inhibant le taux de synthèse de l'hormone juvénile chez les ouvrières, la PGMR interviendrait dans le ralentissement du développement comportemental (Kaatz *et al.*, 1992). Un traitement supplémenté en PGMR inhibe les teneurs en HJ dans l'hémolymphe des abeilles et retarde l'âge du début du butinage (Pankiw *et al.*, 1998).

La phéromone larvaire

Une phéromone, composée de 10 esters d'acides gras, émise sur la cuticule des larves a été identifiée tout d'abord comme étant une kairomone pour un acarien parasite de l'abeille, *varroa jacobsoni* (Le Conte *et al.*, 1989). Ce bouquet phéromonal comprend les esters méthyliques et éthyliques des acides palmitique, linoléique, linoléinique, oléique et stéarique (Le Conte *et al.*, 1990). Les effets de certaines substances de ce mélange se sont révélés être incitateurs pour certains comportements des ouvrières liés aux soins au couvain tels que l'operculation des cellules larvaires (Le Conte *et al.*, 1990), la distinction entre jeunes et vieilles larves (Le Conte *et al.*, 1994), la reconnaissance des cellules royales (Le Conte *et al.*, 1995). Certains des 10 composés sont plus actifs que d'autres pour la réalisation de chacun de ces comportements d'ouvrières mais pris séparément, ils exercent tous une action incitatrice sur les ouvrières.

En plus de ces effets incitateurs, la phéromone de couvain possède aussi des actions modificatrices. Par exemple, le palmitate de méthyle et l'oléate d'éthyle stimulent la synthèse protéique des glandes mandibulaires de nourrices (Mohammedi *et al.*, 1996) et le palmitate d'éthyle inhibe le développement ovarien des ouvrières (Mohammedi *et al.*, 1998). L'ensemble des composés joue un rôle dans la régulation de la division des tâches en inhibant le développement comportemental des ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001).

IV.2.2. Autres mécanismes externes

Ces résultats indiquent que la division du travail entre les ouvrières est sous l'influence de composés phéromonaux. Cependant, il existe d'autres mécanismes tels que la trophallaxie, les patrouilles des ouvrières dans le nid, les danses, qui jouent un rôle dans le contrôle de la division du travail.

Les échanges trophallactiques sont fréquents entre les ouvrières (Park, 1923 ; Rösch, 1925 ; Nixon et Ribbands, 1952) et divers auteurs s'accordent à penser que la trophallaxie joue un rôle dans la répartition des tâches. En effet, Free (1957) et Korst et

Velthuis (1982) démontrent qu'il existe une tendance à ce que la nourriture passe par trophallaxie des ouvrières les plus vieilles vers les plus jeunes. De plus, les échanges ont lieu entre abeilles ayant des jabots remplis de nourriture à niveau égal. Alors que certaines ouvrières sont des receveuses, d'autres se spécialisent en tant que donneuses. Enfin, ils constatent que beaucoup d'échanges trophallactiques ont pour résultat peu ou pas de transfert de nourriture. Mais l'implication de la trophallaxie dans la régulation du polyéthisme reste encore à déterminer.

Les ouvrières passent la plus grande partie de leur temps à patrouiller dans le nid ou à « se reposer » (Lindauer, 1952 ; Kolmes, 1985a). Cette paresse apparente joue probablement un rôle tout à fait important dans la flexibilité du polyéthisme : tout en patrouillant les ouvrières recevraient des informations sur les conditions de la colonie qui déterminent quels travaux sont à effectuer . Les ouvrières « au repos » constitueraient un groupe de réserve qui réagirait aux évènements susceptibles de modifier l'équilibre de la colonie comme l'essaimage, les maladies ou la découverte d'une abondante source de nourriture (Lindauer, 1952).

Les danses de vibrations jouent également un rôle dans la régulation sociale. L'ouvrière accomplit cette danse, en saisissant de ses pattes antérieures le corps d'une autre abeille ou de la reine et en faisant vibrer son abdomen dorso-ventralement (Milum, 1955 ; Allen, 1959a,b). Ces danses augmentent l'efficacité du recrutement des ouvrières au butinage (Schneider *et al.*, 1986a, b). Par contre, des nourrices qui reçoivent les vibrations d'autres individus passent plus de temps à nettoyer les cellules, à s'occuper du couvain et à manipuler la nourriture (Schneider, 1987 ; Schneider et McNally, 1991). Enfin, ces danses sont associées au vols d'orientation (Painter-kurt et Schneider, 1998). Les multiples rôles de ces danses de vibrations montrent que ce système de communication joue un rôle important dans la coordination des différents comportements de la colonie.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'un de ces mécanismes de régulation sociale : l'inhibition exercée par les ouvrières « âgées » sur le développement comportemental des plus jeunes individus de la colonie.

V. Mise en évidence de l'inhibiteur du développement comportemental émis par les butineuses

Afin d'expliquer les principaux mécanismes de la division du travail entre les membres de la colonie, plusieurs modèles théoriques sont étudiés.

Après une description succincte des hypothèses de base de ces principaux modèles, celui de "l'inhibition sociale" sera examiné plus précisément car il est à la base de nos travaux.

V.1. Les modèles théoriques de la régulation de la division du travail chez les insectes sociaux

Beshers et Fewell (2001) ont répertoriés 5 modèles qui tentent d'expliquer les causes de la division du travail chez les insectes sociaux.

-le modèle du « seuil de réponse » (**Response Threshold Models**) est basé sur l'hypothèse que les ouvrières possèdent des seuils internes de réponse aux stimuli spécifiques de chaque tâche. La variation du niveau de ces seuils internes entre les individus engendre la division du travail. Le modèle de Robinson et Page (1989, 1991) suppose que ces différences de seuils internes sont d'ordre génétique.

-le modèle intégrant le seuil de réponse et le transfert d'information (**Integrated Threshold-Information Transfer Models**) repose sur la même hypothèse du seuil de réponse de l'individu à un stimulus donné à laquelle s'ajoute l'hypothèse de la perception variable de chaque stimulus par les ouvrières. En effet ce modèle prend en compte le fait que chaque abeille percevrait directement les besoins de la colonie en rentrant individuellement en contact de façon aléatoire avec les autres ouvrières ou par un

transfert social de l'information touchant simultanément un ensemble d'individus comme par exemple l'émission d'une phéromone.

-le modèle de l'auto-renforcement (Self-Reinforcement Models) est basé sur l'hypothèse du rôle de l'expérience dans l'accomplissement des tâches. Il postule que l'exécution réussie d'une activité augmente la probabilité de réaliser cette tâche une nouvelle fois alors que l'échec ou l'absence d'opportunité de réaliser la tâche réduit la probabilité de réalisation de la tâche. Ce modèle permet d'expliquer l'existence de spécialistes au sein de la colonie. Deneubourg *et al* (1987) suggèrent que le modèle de l'auto-renforcement couplé avec la variation naturelle de l'âge de chaque ouvrière permet d'expliquer la division temporelle du travail.

-le modèle de la recherche de travail (Foraging for Work Models) explique la division temporelle du travail par un simple algorithme de l'accomplissement des tâches qui n'est pas dû à l'âge ou à la taille des ouvrières (Tofts and Franks, 1992). En effet, ce modèle ne suppose aucune relation avec l'âge dans la probabilité d'accomplir une tâche. Les ouvrières poursuivent simplement la tâche en cours jusqu'à ce que les occasions de l'accomplir diminuent au dessous d'un seuil ; à ce moment elles recherchent du travail. Puisque les ouvrières émergent au centre de la colonie, les premières activités qu'elles effectuent sont celles en relation avec le soin au couvain. Au fur et à mesure des naissances, les ouvrières rentrent en compétition pour l'exécution de ces tâches et les individus les plus âgés s'éloignent vers les zones plus périphériques nécessitant la réalisation d'autres travaux. Finalement, les ouvrières atteignent le bord extérieur du nid et se mettent à butiner. Ce modèle peut expliquer le polyéthisme temporel car la progression centrifuge des ouvrières est corrélée à leur âge.

-le modèle de l'inhibition sociale « Social Inhibition Models » explique le polyéthisme temporel comme la résultante de l'interaction entre le processus interne de développement comportemental de chaque individu et les effets inhibiteurs des autres ouvrières (Huang et Robinson, 1999).

V.2. Les modèles de régulation du développement comportemental de Huang et Robinson

Le premier modèle proposé par Huang et Robinson (1992), le modèle « activateur-inhibiteur » suppose que les ouvrières d'une colonie d'abeilles possèdent un activateur interne qui stimule le développement comportemental depuis les tâches d'intérieur jusqu'au stade final du butinage. Cet activateur a été initialement associé à l'hormone juvénile, dont le taux dans l'hémolymphe de l'ouvrière est fortement corrélé avec son développement comportemental (Huang et Robinson, 1999 ; Huang et al., 1994 ; Huang et al., 1991). Sous l'influence de ce seul activateur, les ouvrières deviendraient rapidement des butineuses.

Selon le modèle, l'autre facteur de régulation est un inhibiteur, encore non identifié, qui serait transféré des butineuses vers les abeilles plus jeunes. Cet inhibiteur agirait en opposition aux effets de l'activateur et freinerait le développement comportemental. Ainsi, ce système conduit à un équilibre entre le nombre d'ouvrières d'intérieur et le nombre de butineuses.

Ce modèle expliquerait les formes de plasticité du polyéthisme lié à l'âge. Si par exemple, une partie des butineuses disparaît de la colonie, les interactions entre butineuses et jeunes ouvrières diminuent et par conséquent il n'y a plus de transfert d'inhibiteur. Les abeilles d'intérieur deviennent alors des butineuses précoces et elles présentent un fort taux de HJ. Si au contraire, il y a trop de butineuses, l'inhibition sera plus importante et elle aura pour effet de retarder le développement comportemental des ouvrières plus jeunes qui possèdent de faible taux de HJ. Ainsi, cette inhibition pourrait agir sur le développement en freinant l'accroissement du taux de HJ.

La division des tâches équilibrée entre les ouvrières nécessiterait une quantité équilibrée d'activateur endogène et d'inhibiteur transféré par interactions sociales. Par conséquent, la vitesse du développement comportemental de chaque individu n'est pas un système fixe, intrinsèque à chacun mais plutôt la résultante de nombreuses interactions sociales (Robinson, 1999).

Le modèle activateur-inhibiteur intègre trois niveaux d'organisations biologiques (voir figure 2).

Le premier niveau correspond à la colonie, dans laquelle les individus interagissent les uns avec les autres : les plus âgés inhibant le développement des plus jeunes en transmettant un taux plus élevé d'inhibiteur.

Le second niveau est constitué par l'individu lui-même : trois sous-systèmes sont mis en oeuvre. Les stimulations chez l'abeille induites par les interactions sociales seraient perçues par un système sensoriel périphérique (SP) qui les transformerait en messages nerveux influençant le système endocrine du cerveau (CR). Celui-ci, qui représente le troisième niveau d'organisation biologique, enverrait des signaux à un système de production d'inhibiteur (IP) qui contrôle le niveau d'inhibition chez l'ouvrière elle-même. Des résultats chez d'autres insectes sociaux suggèrent que des cellules neurosécrétrices (CNS) dans la *pars intercerebralis* reçoivent ces signaux et sécrètent des substances stimulant ou inhibant la production de l'activateur, l'HJ, par les *Corpora allata* (Tobe et Stay, 1985).

Le modèle « activateur-inhibiteur » n'est plus approprié car des travaux récents ont montré que l'hormone juvénile ne joue pas le rôle d'activateur du développement comportemental que le modèle lui a assigné (Sullivan et al., 2000). Même si plusieurs études ont souligné une corrélation entre le taux de HJ dans l'hémolymphe des ouvrières et le polyéthisme lié à l'âge, l'HJ n'est pas nécessaire au développement comportemental. Le nouveau modèle de Huang et Robinson, dénommé le modèle de « l'inhibition sociale », met uniquement l'accent sur l'effet inhibiteur des abeilles butineuses qui sont les individus âgés sur le programme de développement comportemental des autres ouvrières de la colonie (Beshers et Fewell, 2001).

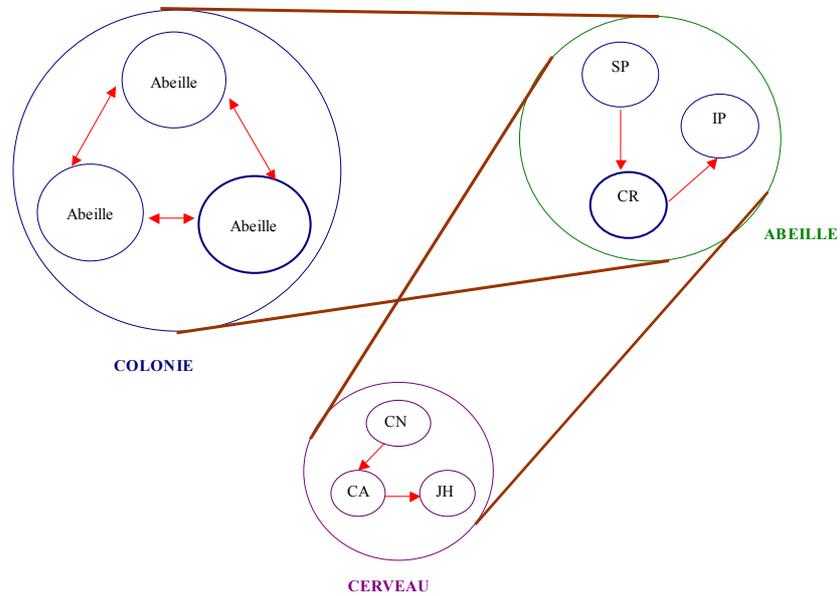


Figure 3 : Les trois niveaux d'organisations biologiques du modèle « activateur-inhibiteur »
 SP : système sensoriel périphérique; IP : production de l'inhibiteur; CR : cerveau; CN : cellules neurosécrétrices; CA : *Corpora allata*; JH : production de l'hormone juvénile (D'après Huang et Robinson, 1999)

V.3. Les expériences de Huang et Robinson afin de caractériser l'inhibition sociale

V.3.1. Les abeilles âgées "inhibent" les plus jeunes

La pyramide des âges des ouvrières constitue un facteur qui régule la division des tâches entre les membres de la colonie (Huang et Robinson, 1992; 1996). Ce facteur est particulièrement important dans la détermination de l'âge au butinage (Winston et Fergusson, 1985).

En effet, il existe une relation très forte entre la quantité d'abeilles âgées et la proportion de butineuses précoces : plus il y a de butineuses, plus le butinage précoce est faible (Huang et Robinson, 1996). Dans une colonie expérimentale composée uniquement de jeunes abeilles, les individus présentent un butinage précoce et commencent à butiner entre 6 et 10 jours au lieu de 21 jours dans des conditions normales. Si des butineuses sont transférées dans cette même colonie, elles inhibent le butinage précoce (Huang et Robinson, 1992).

Est-ce l'absence d'abeilles âgées dans la colonie ou bien le manque d'apport en pollen et nectar frais qui est perçu par les jeunes ouvrières qui butinent précocement ?

Une expérience d'introduction d'abeilles "gardiennes" qui sont en âge d'aller butiner mais qui s'occupent essentiellement de la défense du nid a permis de répondre à cette question. Le transfert de gardiennes, qui ne rapportent donc ni pollen ni nectar au nid, empêche le butinage précoce des ouvrières au même titre que les butineuses. C'est bien la présence d'ouvrières âgées, butineuses ou gardiennes, qui intervient sur le développement comportemental des abeilles (Huang et Robinson, 1992).

D'autres travaux ont montré que l'inhibition du développement des ouvrières était due principalement aux interactions directes avec les butineuses et non pas aux changements de conditions de réserves alimentaires qui pourraient être perçus par les abeilles. En effet, l'inhibition par les butineuses transplantées dans une colonie de jeunes abeilles,

persiste même si on empêche les butineuses transférées de butiner (Huang et Robinson, 1992).

Cela signifie que les jeunes abeilles résidentes sont vraisemblablement inhibées directement par les butineuses, plutôt que stimulées à butiner par quelque changement dans l'environnement de la ruche.

Des expériences réalisées en laboratoire apportent les mêmes conclusions. Des abeilles d'un jour sont élevées pendant une semaine individuellement, en petit groupe ou dans des colonies normales. Les ouvrières rassemblées en petit groupe sont physiologiquement comparables au stade de nourrice car elles présentent un taux de HJ bas. En revanche, les abeilles isolées qui sont donc privées de tout contact possèdent des taux de HJ très élevés et sont susceptibles de partir butiner plus tôt que les abeilles qui sont dans les deux autres conditions d'élevage (Huang et Robinson, 1992).

D'autres études confirment que les changements de conditions du nid ne jouent pas un rôle majeur dans le contrôle du développement comportemental des ouvrières. En effet, une baisse des réserves alimentaires entraîne un butinage précoce des ouvrières. Cependant, cette réponse au stimulus de faim n'est pas liée aux quantités de nourriture stockée. Si les abeilles sont alimentées par du sucre mais ne peuvent pas faire de réserves dans leur colonie, leur taux de développement comportemental est similaire à celui d'abeilles placées dans une colonie approvisionnée normalement (Schulz et *al.*, 1998). L'effet de la faim sur le développement des abeilles n'est donc pas transmis par des interactions directes entre les abeilles et les réserves alimentaires.

Des expériences utilisant des ruches plus proches de colonies standards ont apporté les mêmes résultats sur le butinage précoce des ouvrières en l'absence de butineuses (Huang et Robinson, 1996). Si on supprime une partie des butineuses comme pour simuler une prédation, les jeunes abeilles de la colonie se développent plus vite que les jeunes abeilles de la colonie témoin dans laquelle des abeilles de tout âge ont été enlevées.

A l'opposé, quand les butineuses sont confinées dans la ruche par temps de pluie, le développement comportemental des jeunes ouvrières est retardé.

L'ensemble de ces résultats souligne que la division temporelle du travail est régulée par des échanges d'informations entre les membres de la société ; les abeilles âgées semblent

agir, en le freinant, sur le développement comportemental des jeunes ouvrières de la colonie, programme dont on ne connaît pas encore les mécanismes.

V.3.2. L'inhibition de contact

L'action de l'inhibiteur du développement comportemental émis par les ouvrières âgées nécessiterait le contact entre les individus (Huang et Robinson, 1998). Dans leurs expériences, des abeilles émergentes ont été élevées pendant une semaine dans des colonies de trois façons différentes. La première façon consiste à isoler chaque abeille émergente du reste de la colonie en l'enfermant dans une cage à double paroi pour éviter tout contact physique avec les autres membres. Un second lot d'abeilles est composé d'abeilles émergentes, placées chacune dans une cage à paroi unique permettant seulement les contacts antennaires et les échanges de nourriture. Le troisième groupe d'ouvrières émergentes n'est pas isolé et constitue le témoin. Les abeilles se trouvant dans les cages à double paroi présentent toujours un taux d'hormone juvénile (HJ) plus élevé que chez le témoin et sont plus disposées à devenir des butineuses précoces que les abeilles isolées du reste de la société par une seule paroi. De plus, chez les abeilles isolées par une paroi simple, le taux de HJ ainsi que le butinage précoce sont observés à des degrés intermédiaires aux deux autres groupes. Les auteurs concluent que l'inhibition serait transmise par contact entre les individus. Cependant il existe un biais non négligeable dans cette expérience car les abeilles isolées par une double paroi sont également privées des autres phéromones de contact connues qui inhibent le développement comportemental : la phéromone des glandes mandibulaires de la reine et la phéromone sécrétée par le couvain (Pankiw *et al.*, 1998 ; Le Conte *et al.*, 2001). Ainsi le développement précoce qui est observé chez ces abeilles pourrait provenir de l'absence de contact avec ces autres phéromones qui masquerait l'effet de l'éventuelle phéromone de butineuses. L'inhibition exercée par les butineuses pourrait donc être transmise par contact, comme le supposent les auteurs ; ceci n'écarte cependant pas l'hypothèse qu'elle pourrait être de nature volatile et ne s'exprimer qu'en synergie avec d'autres phéromones telles que les phéromones de la reine ou du couvain.

Cependant si on fait l'hypothèse d'une phéromone de contact, l'inhibition pourrait se faire par l'intermédiaire de la trophallaxie, des contacts antennaires ou cuticulaires, du léchage ou d'une combinaison de tous ces facteurs.

Ces mêmes chercheurs ont également commencé à tester l'hypothèse d'après laquelle les glandes mandibulaires de butineuses pourraient être à l'origine de l'inhibition de contact. Cette hypothèse a été émise car le composé majoritaire dans les glandes mandibulaires d'ouvrières, est l'acide 10 hydroxy-décénoïque (10-HDA) (Butler, 1966), de structure voisine de l'acide 9-oxo-(E)-2-décénoïque (9-ODA). Or la molécule 9-ODA est prépondérante dans la phéromone des glandes mandibulaires de la reine, phéromone connue pour exercer une inhibition sur le développement comportemental des ouvrières (Pankiw et al., 1998). Les expériences ont consisté à enlever les glandes mandibulaires chez des butineuses âgées et à mettre en présence ces abeilles ainsi opérées et des abeilles émergentes. L'âge au butinage des jeunes est comparé à celui d'une colonie témoin contenant des butineuses intactes. Il ressort que les abeilles sont plus précoces au butinage lorsqu'elles sont au contact de butineuses privées de glandes mandibulaires. Les glandes mandibulaires pourraient donc contenir l'inhibiteur du développement comportemental des jeunes ouvrières.

D'autres études sur les différences de comportement au butinage entre trois races d'*Apis mellifera* font également ressortir l'existence d'un facteur inhibiteur des butineuses. En effet, les butineuses de la race *ligustica* exercent une inhibition plus forte sur le développement comportemental des jeunes abeilles que les butineuses des races *mellifera* et *caucasica* (Brillet et al., 2002).

OBJECTIFS

Cette thèse vise à caractériser l'un des mécanismes impliqué dans la régulation sociale de la colonie d'*Apis mellifera* L. : l'inhibition sociale exercée par les ouvrières âgées sur le développement comportemental des plus jeunes de la société.

Afin de caractériser l'inhibition sociale, nous avons utilisé différentes approches expérimentales.

Tout d'abord, nous allons comparer l'inhibition exercée par les butineuses sur le développement comportemental et physiologique de jeunes ouvrières entre trois races d'*Apis mellifera* L. (*A.m. ligustica*, *A.m. mellifera* et *A.m. caucasica*). Si nous confirmions l'expression du pouvoir inhibiteur des butineuses chez une seule des trois races, comme le montre déjà un précédent travail de Brillet *et al.* (2001), alors nous pourrions utiliser cette race pour identifier l'inhibiteur (**Partie 2**).

Puis nous allons chercher à caractériser la nature de l'inhibition sociale. Est-elle provoquée par des interactions comportementales entre les ouvrières ou est-elle chimique ? Pour répondre à cette question, nous allons étudier les comportements de jeunes ouvrières en présence ou non d'abeilles âgées dans des ruches d'observation (**Partie 3**).

Si l'inhibition est chimique, nous allons tester si elle met en jeu des molécules volatiles ou non volatiles.

Pour le savoir, des expériences de comportement vont être réalisées qui empêchent tout contact physique entre des jeunes ouvrières et des abeilles âgées de la même colonie. Le développement comportemental des jeunes est alors comparé à d'autres colonies dans lesquelles les jeunes abeilles peuvent échanger des contacts avec les abeilles âgées (**Partie 4**).

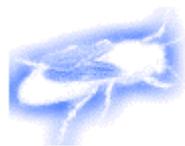
Si l'inhibition est volatile, nous allons entreprendre des expériences de piégeages d'odeurs émises par les ouvrières âgées. Puis des expériences de comportement vont permettre de tester l'effet de l'extrait total ainsi obtenu sur le développement comportemental de jeunes abeilles. En fonction de son activité inhibitrice, cet extrait va être purifié et testé à nouveau en expérience de comportement. L'opération sera répétée jusqu'à l'obtention du plus petit extrait actif. Ce dernier sera alors analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM) afin d'identifier la ou les molécules volatiles inhibitrices.

Si l'inhibition est non volatile, les molécules sont présentes dans l'organisme des butineuses ou sur leur cuticule. Nous pouvons alors entreprendre deux approches expérimentales.

- La première vise à caractériser une fraction active de butineuses sur l'inhibition du développement comportemental de jeunes ouvrières. Pour cela, différents extraits de butineuses sont réalisés puis testés sur le développement comportemental de jeunes individus par des expériences comportementales. Si un des extraits inhibe le développement des jeunes, il sera fractionné et l'effet biologique de chaque nouvelle fraction sera analysé de la même façon. Ce procédé sera répété jusqu'à l'identification des seules molécules responsables de l'inhibition (**Partie 5**).
- La seconde démarche consiste à comparer les profils chimiques de nourrices et de butineuses afin de mettre en évidence des molécules spécifiques de butineuses. L'effet inhibiteur de ces molécules va être ensuite testé sur le comportement pour savoir si elles interviennent dans l'inhibition exercée par les butineuses (**Partie 6**)

Partie 2

Développement comportemental
des jeunes ouvrières
et pouvoir inhibiteur des butineuses :
comparaison entre trois races d'abeilles
domestiques (*Apis mellifera* L.)



I. Objectif et principe de l'expérience

Cette étude porte sur la comparaison du rythme de développement comportemental des ouvrières et du pouvoir inhibiteur des butineuses entre trois races d'*Apis mellifera* (*A. m. mellifera*, *A. m. caucasica* et *A. m. ligustica*). Ces races diffèrent par leur origine géographique et par des caractéristiques comportementales (Louveaux, 1966; Pham-Delegue et al., 1984; Ruttner, 1988; Guzman-Novoa et al., 1994; Sheppard, 1997). Notre travail vient compléter celui de Brillet *et al.* (2002) qui a montré que la régulation du développement comportemental des ouvrières est sous la dépendance de deux facteurs génétiques, la race de l'individu, qui contrôle son rythme de développement ainsi que sa sensibilité aux influences sociales, et la race des autres membres de la colonie qui influe sur la précocité du butinage des jeunes ouvrières. Les résultats ont révélé que *A.m. ligustica* est la race la plus précoce et celle dont les butineuses âgées possèdent le plus fort pouvoir inhibiteur sur les jeunes individus. Dans ces expériences, des colonies standards, gérées par des techniques apicoles classiques avaient été utilisées. Chacune était composée d'environ 30 000 individus de tous âges, possédant une reine et du couvain, deux éléments qui exercent une influence sur l'âge au butinage des jeunes ouvrières (Pankiw *et al.*, 1998 et Le Conte *et al.*, 2001).

Notre objectif est d'étudier l'inhibition due aux butineuses de chaque race en contrôlant l'apport dans les colonies des deux autres phéromones inhibitrices du développement comportemental des ouvrières : la phéromone de reine et celle de couvain. Pour cela, nous avons travaillé avec de petites colonies expérimentales constituées de 1200 ouvrières, les quantités de phéromones de reine et de couvain étant similaires entre toutes les colonies. Ainsi, dans ces conditions standardisées, nous pouvons mettre en évidence l'inhibition due aux seules butineuses âgées en ne faisant varier que deux paramètres dans ces colonies expérimentales : la présence et la race des butineuses âgées. De plus, nous pouvons comparer dans de telles sociétés le développement comportemental des jeunes abeilles de

chaque race. Les deux critères étudiés sont l'âge au butinage des jeunes abeilles et la mesure de leur taux d'hormone juvénile (HJ). En effet, on cherche à savoir si les différences d'âge au butinage entre les trois races sont dues à des caractéristiques raciales de production de HJ ou de sensibilité à cette hormone ou bien à un pouvoir inhibiteur des butineuses âgées variable suivant leur race et celle des jeunes abeilles placées en leur présence.

Cette étude a été réalisée au Laboratoire de Protection et Biologie de l'abeille (UMR INRA-UAPV, Avignon), en collaboration avec Charles Brillet qui en a assuré la partie comportementale. L'essentiel de ma contribution à ce travail a été d'effectuer les analyses chimiques de dosage de l'HJ dans l'hémolymphe des abeilles au département d'Entomologie (Université Urbana-Champaign, Illinois, E.U.) dirigé par le Professeur Gene Robinson.

II. Matériel et méthode

II.1. Matériel biologique

Comme dans la première étude comparative (Brillet *et al.*, 2002) trois races européennes d'*Apis mellifera* ont été utilisées: *Apis mellifera mellifera*, *A. m. ligustica* et *A. m. caucasica*. Les abeilles des colonies expérimentales sont issues de colonies standards de chaque race. Les déterminations raciales de ces colonies d'origine ont été réalisées par R. Bues qui a effectué des analyses électrophorétiques de migration d'une enzyme dont le locus est spécifique de chaque race, la malate déshydrogénase (Cornuet, 1983).

II.2. Colonies expérimentales

Les expériences ont été conduites en **colonies à double cohortes**, chaque cohorte correspondant à un groupe d'ouvrières d'âge identique ou exécutant une même fonction. Chaque colonie est composée d'une première cohorte de 600 abeilles émergentes, 200 de chaque race. Ces abeilles émergentes sont obtenues à partir de cadres de couvain operculé prêt à éclore. Les cadres sont retirés des colonies d'origine la veille de la constitution des *nuclei* et placés dans une étuve à 34°C. Les abeilles qui émergent durant les 24 heures qui suivent sont considérées comme ayant un jour de vie adulte. Les abeilles appartenant à une même race ont été marquées d'un point de peinture de couleur spécifique sur la face dorsale du thorax. L'âge au butinage ainsi que le taux d'hormone juvénile (HJ) de ces 600 jeunes abeilles vont être déterminés au cours de l'expérience. La seconde cohorte d'abeilles comprend 600 butineuses, non marquées, d'une des trois races. Les butineuses sont prélevées en fonction de leur tâche dans la colonie d'origine,

leur âge est par conséquent inconnu. Pour cela, l'entrée de la colonie est bloquée par une grille, ce qui permet d'aspirer (à l'aide d'un aspirateur portatif) les butineuses qui, de retour de leur activité, cherchent à rentrer dans leur ruche. Ces dernières sont facilement repérables car elles possèdent des pelotes de pollen accrochés à leur pattes postérieures ou leur abdomen est distendu par la charge de nectar.

Une colonie témoin, **colonie à simple cohorte**, ne renferme que des abeilles émergentes de chacune des trois races.

Les abeilles, en colonies à simple ou double cohortes, sont placées sur le terrain dans des ruches de petite taille (40 cm x 30 cm x 30 cm) appelées *nuclei* (voir photo 1). Chaque *nucleus* comporte deux cadres bâtis, l'un chargé de miel, pour constituer des ressources alimentaires, le second vide pour inciter les abeilles à sortir récolter.

Afin de maintenir la cohésion du groupe, un leurre de phéromone royale est placé dans chaque colonie (phéromone sécrétée par les glandes mandibulaires de la reine). Il s'agit d'un petit tuyau de plastique plein de 5 cm de long et de 2 mm de diamètre qui libère la phéromone de synthèse (1 équivalent-reine par jour) que les ouvrières viennent lécher. Ce leurre est commercialisé par la société Phero Tech INC. Il est utilisé pour certaines pratiques apicoles comme la réalisation d'essaims d'abeilles ou la pollinisation sous serre (voir photo 2).



Photo 1 : ruchette d'expérimentation appelée *nucleus*



Photo 2 : cadres de nucleus.

Celui de gauche est vide et il comporte la phéromone royale

Celui de droite est chargé de miel

Chaque série d'expérience regroupe quatre *nuclei* différents (voir figure 3):

-600 abeilles émergentes marquées des trois races (200 *ligustica*, 200 *caucasica*, 200 *mellifera*) et 600 butineuses âgées *ligustica*.

-600 abeilles émergentes marquées des trois races et 600 butineuses âgées *caucasica*.

-600 abeilles émergentes marquées des trois races et 600 butineuses âgées *mellifera*.

-une colonie témoin ne contient pas de butineuses âgées mais 400 nouvelles-nées de chacune des trois races marquées (400X3).

L'expérience a été répétée 6 fois.



Figure 4 : Schéma du protocole de l'expérience de comparaisons raciales

Pour chacune des 6 séries, des colonies différentes ont fourni les abeilles nécessaires. Ces colonies sont situées à plus de 10 Km du lieu de l'expérience afin d'éviter un retour des butineuses âgées vers leurs ruches d'origine.

Chaque *nucleus* reçoit un leurre de phéromone mandibulaire de reine et de la phéromone de couvain de synthèse. Cette dernière est composée des 10 esters d'acides gras identifiés dans les proportions correspondantes à celles trouvées chez des larves de 4 à 5 jours (Trouiller *et al.*, 1992). 10 mg de phéromone larvaire sont mélangés à un gramme de candi (1 partie de miel/1,5 partie de sucre glace). Cette dose qui correspond à 6200 équivalents larves est administrée quotidiennement aux colonies. La phéromone est mélangée à du candi car on ne sait pas comment elle est transmise aux ouvrières : par contacts antennaires ou par ingestion. Cette forme de traitement permettant ces deux modes de transmission est par conséquent bien adaptée (Le Conte *et al.*, 2001).

Pour que l'environnement dans lequel évoluent les abeilles varie le moins possible d'une colonie à l'autre, les *nuclei* sont placés dans un même endroit. Les quatre *nuclei* sont alignés sur le terrain avec un intervalle de 10 mètres entre deux, afin de limiter une éventuelle dérive. Ils ont été ouverts trois jours après l'introduction des abeilles.

La population de ces colonies est plus petite qu'une véritable société d'*Apis mellifera* L. mais elle permet de contrôler précisément des variables importantes susceptibles d'affecter le développement comportemental des ouvrières comme la structure démographique, la structure génétique ou les ressources alimentaires de la colonie (Giray et Robinson, 1994 ; Huang et Robinson, 1996 ; Schulz *et al.*, 1998 ; Le Conte *et al.*, 2001). Toutefois, dans ces conditions expérimentales, les abeilles présentent un rythme de développement comportemental normal (Giray et Robinson, 1994) correspondant à la variable comportementale étudiée.

II.3. Observation du butinage

Le critère de développement comportemental pris en compte est l'âge au butinage des abeilles émergentes. Il est choisi car il caractérise l'étape la plus brutale et la plus facilement observable du développement comportemental. Ce paramètre a déjà été utilisé dans de nombreuses études (Robinson, 1987a, 1987b ; Robinson *et al.*, 1989 ; Giray *et al.*, 2000 ; Le Conte *et al.*, 2001 ; Brillet *et al.*, 2002).

Les observations ont été réalisées lorsque les jeunes abeilles ont entre 7 et 20 jours pour déterminer l'âge auquel apparaît le début du butinage dans les différentes races d'abeilles. Chaque *nucleus* a été observé quotidiennement à raison de 45 min/jour réparties en tranche de 5 min échelonnées entre 9h et 17h. L'entrée du *nucleus* est fermée par une grille et les abeilles revenant à la ruche s'agglutinent sur la grille. Parmi les abeilles, il est possible de distinguer les butineuses, possédant des pelotes de pollen et les butineuses chargées de nectar, dont l'abdomen est distendu (Huang et Robinson, 1992). Les jeunes butineuses nectar ou pollen sont capturées et éliminées et les autres ouvrières, réintroduites dans la colonie.

A la fin de chaque expérimentation, les abeilles de chaque *nucleus* sont anesthésiées au CO₂ et dénombrées afin de savoir si les populations sont restées de même grandeur.

Les résultats sont exprimés en pourcentage du nombre de nouvelles-nées introduites ; les pourcentages cumulés à 7, 10, 15 et 20 jours sont utilisés dans l'analyse des résultats.

II.4. Mesure du taux de HJ dans l'hémolymphe des abeilles

Les dosages de HJ sont réalisés individuellement sur les abeilles marquées. Pour chaque race introduite dans chaque colonie, 10 abeilles sont analysées à 7 et 14 jours. Les ouvrières sont directement prélevées à l'intérieur de chaque *nucleus*, le matin, avant la période de butinage lorsque toutes les abeilles sont encore au nid pour obtenir un échantillon le plus représentatif de la population.

II.4.1. Prélèvement de l'hémolymphe

Pour doser l'hormone juvénile, on prélève sur chaque abeille vivante une quantité connue d'hémolymphe. Pour cela, les abeilles sont maintenues au froid (4°C) pendant 10 minutes puis immobilisées sur une boîte de Petri. Le prélèvement se fait au moyen d'un micro-capillaire de 50 μ l introduit au travers de la membrane inter-segmentaire entre le troisième et le quatrième tergite. Pour chaque abeille, l'hémolymphe est déposée dans un tube en verre individuel contenant 500 μ l d'acétonitrile et stockée à -20°C.

II.4.2. Détermination du taux de HJ

La méthode de détermination du taux de HJ comporte deux étapes :

-l'extraction de l'HJ dans l'hémolymphe

-le dosage de l'HJ par dosage radio-immunologique (Radio Immuno Assay :

RIA)

La technique de RIA a été développée par Hunnicutt *et al.* (1989) et validée sur l'abeille adulte par Huang *et al.* (1994).

La première étape consiste à extraire l'HJ en ajoutant 1 ml d'une solution de NaCl à 0.9 % et 1 ml d'hexane au mélange d'acétonitrile et d'hémolymphe. Ainsi, les constituants aqueux de l'hémolymphe comme les protéines seront extraits dans la solution saline alors que les composés lipophiles comme l'HJ sont extraits dans l'hexane. Après avoir été vigoureusement homogénéisés, les échantillons sont refroidis dans de la glace pendant 10 min, puis centrifugés à 2000 tours/min, pendant 5 min à 4°C. Le surnageant hexanique contenant l'HJ est alors prélevé. Une nouvelle extraction, suivant le même protocole que la première, est alors réalisée sur la solution restante et les deux surnageants sont additionnés. Ce nouvel extrait est alors concentré à sec dans une centrifugeuse sous vide (Salvant SC110).

La seconde phase de l'expérience est le dosage radio-immunologique de l'HJ. Le principe de cette méthode repose sur la compétition entre un antigène non marqué (Ag, l'hormone juvénile) et un antigène identique mais marqué (Ag^*) pour les anticorps spécifiques (Ac). L'anticorps est obtenu en injectant l'antigène à un lapin. L'analogue radioactif de l'antigène naturel est l'HJ tritiée. Il se produit alors la réaction suivante :



Ag^* et Ac sont apportés en quantité connue.

Ag^* se fixe à l'anticorps en fonction de la quantité de Ag, ce qui permet de calculer la quantité d'Ag. Plus il y a d'antigène froid, plus le complexe antigène marqué-anticorps diminue.

Un mélange contenant 100 μ l d'antisérum, 32 μ l de HJ radioactive et 14 ml de gel-PBST (solution tampon phospho-alcaline à 0.9 % de NaCl et 0.01 % de Triton X-100) est préparé. 200 μ l de cette solution sont ajoutés dans chaque échantillon. L'incubation dure

2 heures à température ambiante. Après refroidissement pendant 10 min dans la glace, l'HJ radioactive non liée est séparée de l'HJ liée en ajoutant du charbon actif à la solution et en centrifugeant pendant 3 min à 2000 tours/min à 4°C. La radioactivité du surnageant est quantifiée par spectrométrie liquide de scintillation (Beckman LS6000IC).

La proportion de produit radioactif qui s'est fixé, par compétition avec l'antigène froid, donne la quantité de l'hormone. Cette mesure est reportée sur une courbe de référence. Celle-ci a été préalablement établie en calculant le taux de liaisons formées entre l'anticorps et l'HJ radioactive en présence de concentrations différentes de HJ froide. En partant d'une solution mère de 10^{-4} M de HJ il est possible d'effectuer une série de dilutions donnant la courbe de référence.

II.5. Analyses statistiques

Une analyse de déviance (ANODEV) pour modèle linéaire généralisé (MLG) a été utilisée afin de rendre compte des différences de proportions de butineuses (Collett, 1991). Les quatre facteurs testés sont la race des jeunes abeilles, la race des butineuses âgées, l'âge et la série. Les tests du Khi-Deux ou celui de « la plus petite différence significative » de Fisher (PPDS de Fisher) au seuil de significativité de 5% sont employés pour les comparaisons deux à deux. Les analyses ont été faites avec S-PLUS par Andy Barron du laboratoire d'entomologie de l'Université d'Illinois.

Une analyse de variance est réalisée pour le traitement des données de HJ (Stat View (SAS Institute Inc. 1992-1998)). Les effets de la série, de l'âge ainsi que les effets de la race des jeunes abeilles et de la race hôte ont été testés. Les comparaisons deux à deux sont évalués par le test de PPDS de Fisher au seuil de significativité de 5% sur Stat View.

III. Résultats

III.1. Age au butinage

Il existe des effets significatifs des différents facteurs sur le butinage des jeunes ouvrières marquées (voir tableau 3 et figure 5) :

-les proportions de jeunes butineuses varient en fonction de leur race ($P < 0.001$).

-la race des butineuses âgées influence également le butinage des jeunes ouvrières ($P < 0.001$).

-les races des jeunes abeilles interagissent avec les races des butineuses âgées des colonies, l'interaction race des jeunes/race des butineuses âgées étant significative ($P = 0.017$).

-les proportions des nouvelles butineuses sont significativement différentes en fonction de l'âge, quelle que soit la race ($P < 0.001$).

-il existe un effet série sur le butinage des jeunes abeilles ($P < 0.001$).

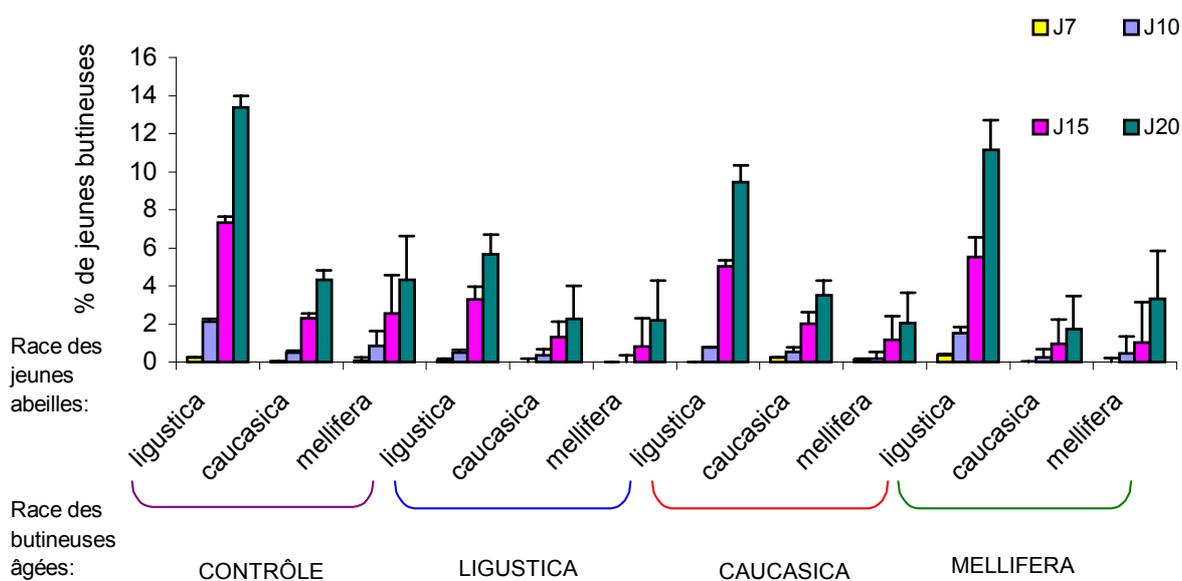


Figure 5 : Effet de la race des jeunes abeilles et de la race des butineuses âgées sur le pourcentage de butinage des abeilles âgées de 7 à 20 jours.

Term	Residual deviance	Residual df	Δ deviance	Δ df	P (χ^2)
Null	2431.456	215			
Race jeunes	1806.366	213	625.089	2	<0.001
Race âgées	1650.005	210	156.361	3	<0.001
Série	1272.582	205	377.423	5	<0.001
Age	617.163	203	655.418	2	<0.001
Race jeunes : Race âgées	586.006	197	31.157	6	0.017
Race jeunes : Série	388.676	187	197.329	10	<0.001
Race âgées : Série	257.132	172	131.503	15	<0.001
Série : Age	181.071	162	76.100	10	<0.001
Race jeune : race âgée : Série	102.315	132	78.756	30	<0.001

Tableau 3 : ANODEV pour MLG testant l'hypothèse nulle : les proportions de nouvelles butineuses ne varient pas en fonction de leur race (Race jeune), de la race des butineuses âgées (Race âgée), de leur âge ou de la série.

III.1.1. Effet de la race des jeunes abeilles sur le butinage

Afin de mettre en évidence un effet de la race des jeunes abeilles sur leur butinage, les résultats de butinage ont été regroupés pour chaque race de jeunes abeilles, quelle que soit la race des butineuses âgées. Les résultats sont comparés au butinage des trois races de jeunes dans les colonies sans butineuses âgées (voir figure 6 et tableau 4).

- **La race *ligustica* se montre la plus précoce.** En effet dans les colonies privées de butineuses, dès 10 jours 2% des *ligustica* butinent contre 0.5 % d'abeilles *caucasica* et 0.8 % d'abeilles *mellifera*. La différence est significative entre les *ligustica* et les *caucasica* ($P=0.02$).

Dans les colonies possédant des butineuses âgées, c'est toujours *ligustica* qui butine le plus tôt, et la différence est significative à 20 jours : 9 % des *ligustica* butinent contre 2.5 % des *caucasica* ($P = 0.01$) et 2.5 % des *mellifera* ($P = 0.01$).

- **La comparaison entre les *ligustica* dans les colonies témoins et les deux autres races dans les colonies avec butineuses âgées montre un butinage plus précoce des *ligustica* chez les témoins.**

Dès 10 jours, les *ligustica* dans les colonies témoins butinent significativement plus tôt que les *caucasica* ou les *mellifera* qui sont elles avec des butineuses âgées ($P=0.01$ et $p=0.005$ respectivement). Cette différence significative se retrouve à 15 jours, ($P=0.004$ et $P= 0.002$ respectivement). A 20 jours, *ligustica* chez les témoins butine plus tôt que *caucasica* en présence de butineuses ($P<0.0001$).

En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les *ligustica* placées dans les deux conditions même si elles ont tendance à butiner un peu plus tôt dans les colonies sans butineuses âgées (à 20 jours, $P = 0.05$).

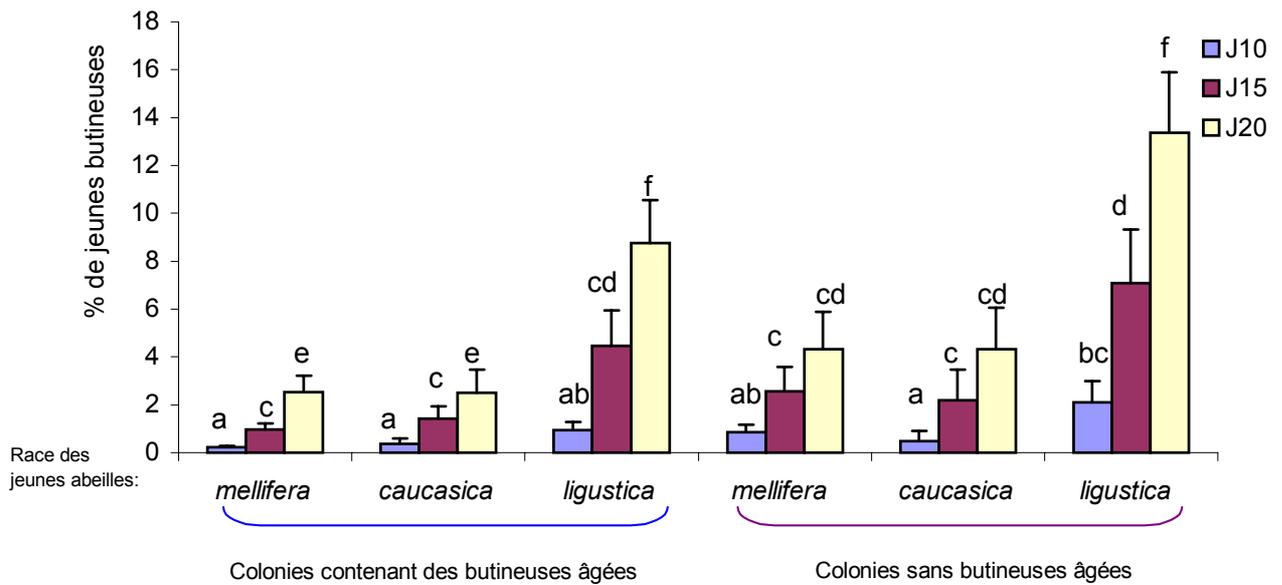


Figure 6 : Effet de la race des jeunes abeilles sur les pourcentages cumulés de nouvelles butineuses à 10, 15 et 20 jours.

Les races des jeunes abeilles sont indiquées sur le graphe : mellifera, caucasica et ligustica.

Lorsque les comparaisons 2 à 2 entre les races de jeunes abeilles aboutissent à des différences significatives, les lettres sont différentes (test de Fisher à 5%, voir tableau 4).

		DIFF.	DIFF.	VALEUR
J10	caucasica, control ligustica	-1,732	1,301	0,0108
	control caucasica, control ligustica	-1,619	1,301	0,0164
	control ligustica, mellifera	1,892	1,301	0,0058
J15	caucasica, control ligustica	-5,646	3,778	0,0047
	control caucasica, control ligustica	-4,875	3,778	0,0132
	control ligustica, control mellifera	4,512	3,778	0,0209
	control ligustica, mellifera	6,112	3,778	0,0025
J20	caucasica, control ligustica	-10,85	4,767	<,0001
	caucasica, ligustica	-6,249	4,767	0,0119
	control caucasica, control ligustica	-9,028	4,767	0,0005
	control ligustica, control mellifera	9,05	4,767	0,0005
	control ligustica, mellifera	10,835	4,767	<,0001
	ligustica, mellifera	6,233	4,767	0,0121

Tableau 4 : Résultats des différences significatives de butinage entre deux races de jeunes abeilles du même âge.

Effet testé : race des jeunes abeilles Seuil de significativité : 5%

Caucasica, mellifera et ligustica = races de jeunes abeilles dans les colonies avec butineuses

âgées Control caucasica, control ligustica et control mellifera = races des jeunes abeilles dans

les colonies sans butineuses âgées.

III.1.2. Effet de la race des butineuses âgées sur le butinage

Afin de caractériser un effet significatif des races de butineuses âgées sur le butinage des jeunes, les données de butinage des jeunes ont été regroupées en fonction de la race des butineuses âgées, quelle que soit la race des jeunes abeilles (voir figure 7).

- A 20 jours, les proportions de butineuses varient significativement entre les colonies avec des butineuses âgées *ligustica* et les colonies sans butineuses âgées. En effet, 7 % des abeilles butinent dans les colonies privées de butineuses âgées et seulement 2% butinent dans la colonie de butineuses âgées *ligustica* ($P=0.04$). Si on compare les trois races de butineuses âgées deux à deux, à 20 jours il n'y a pas de différence de butinage des jeunes abeilles :

-*ligustica/mellifera* (test de Fisher : Diff. Moy=-2.02, Diff. Crit.=3.76, $P = 0.27$)

-*ligustica/caucasica* (test de Fisher : Diff. Moy=1.62, Diff. Crit.=3.76, $P = 0.38$)

-*mellifera/caucasica* (test de Fisher : Diff. Moy=-0.4, Diff. Crit.=3.77, $P = 0.83$)

III.1.3. Comparaison du butinage des jeunes abeilles en présence de butineuses âgées de leur propre race

Nous considérons à présent le butinage de chaque race de jeunes de 7 à 20 jours en fonction de la colonie dans laquelle elle se trouve (voir figure 5).

- Chez *ligustica* seulement, les jeunes butinent plus tard lorsqu'elles sont en présence de butineuses âgées de leur propre race. Les différences sont significatives à 15 jours : *ligustica* dans la colonie *ligustica* comparé à *ligustica* dans la colonie *mellifera* ($\chi^2 = 24.67$, $n = 60$, $P < 0.001$) et *ligustica* dans la colonie *ligustica* comparé à *ligustica* dans la colonie *caucasica* ($\chi^2 = 12.26$, $n = 60$, $P = 0.05$).

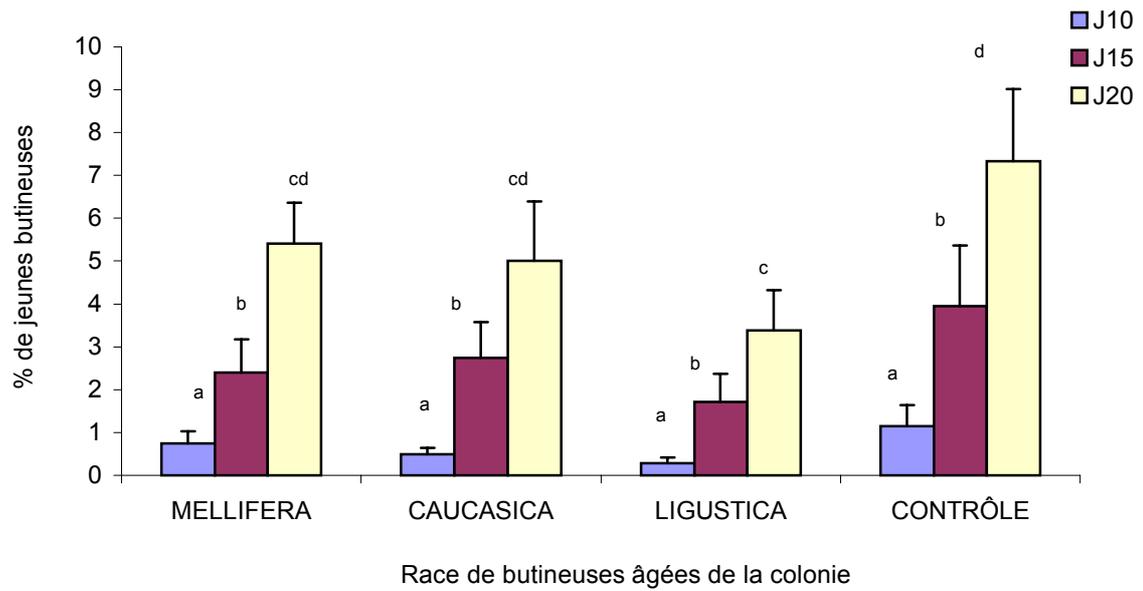


Figure 7 : Effet de la race des butineuses âgées (race hôte) sur le butinage des ouvrières à 10, 15 et 20 jours.

Contrôle = colonies sans butineuses âgées.

Lorsque les comparaisons 2 à 2 entre les races de butineuses âgées sont significatives, elles sont indiquées par des lettres différentes (test de Fisher au seuil de 5 %).

III.2. Dosages de HJ

Il existe des effets globaux significatifs sur le taux de HJ des jeunes abeilles (voir tableau 5 et figure 8) :

-le taux de HJ varie significativement en fonction de la race des jeunes abeilles (F=34.52, P<0.0001)

-il existe aussi un effet de la race des butineuses âgées sur le taux de HJ des jeunes abeilles (F=10.16, P<0.0001).

-entre 7 et 14 jours, le taux de HJ augmente, passant en moyenne de 50ng/ μ l/abeille à 59ng/ μ l/abeille. Cette différence est significative (F=5.49, P=0.0193).

-parmi les 6 séries, on note un effet de la série sur le taux de HJ (F=24.04, P<0.001).

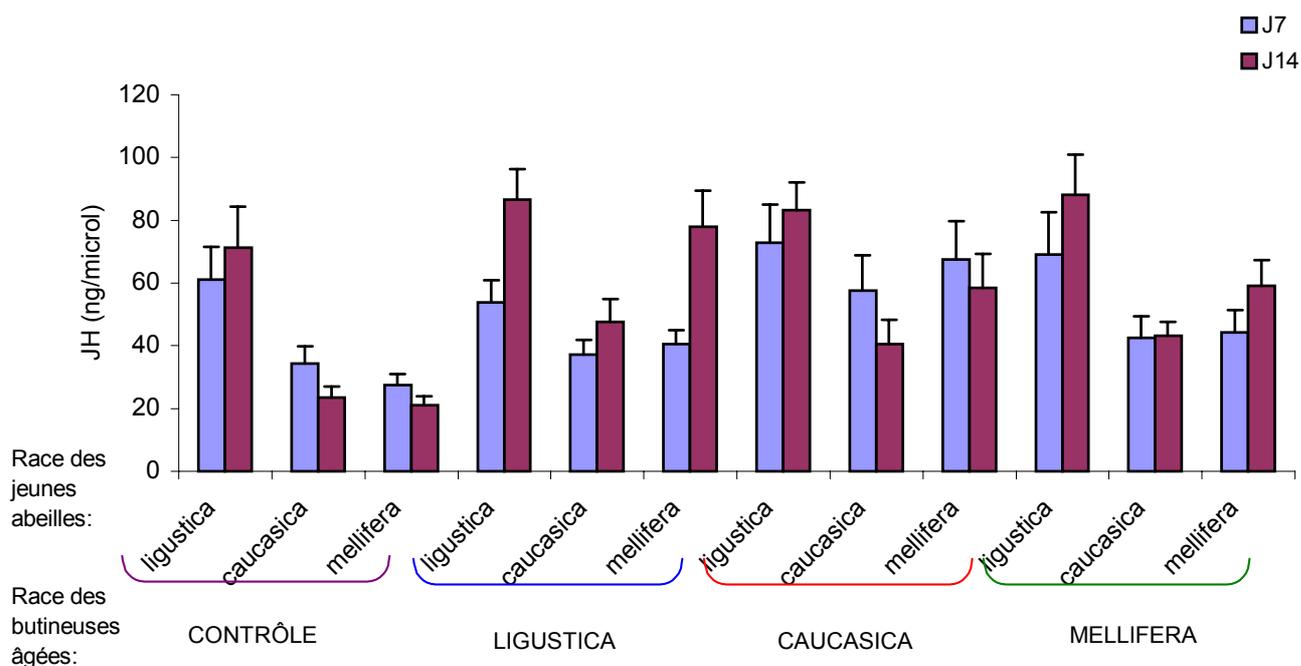


Figure 8 : Effet de la race des jeunes abeilles et de la race des butineuses âgées sur le taux de HJ des abeilles âgées de 7 et 14 jours.

	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	Valeur de F	Valeur de p	Lambda	Puissance
Race âgées	3	116396,789	38798,93	10,159	<,0001	30,478	1
Race jeunes	2	263669,378	131834,689	34,521	<,0001	69,041	1
Age	1	20949,501	20949,501	5,486	0,0193	5,486	0,646
Série	5	459029,714	91805,943	24,039	<,0001	120,196	1
race butineuse * race introduite	6	28102,396	4683,733	1,226	0,2898	7,359	0,481
race butineuse * age	3	64284,077	21428,026	5,611	0,0008	16,833	0,956
race butineuse * serie	15	396810,748	26454,05	6,927	<,0001	103,904	1
race introduite * age	2	26372,29	13186,145	3,453	0,032	6,906	0,643
race introduite * serie	10	36971,165	3697,117	0,968	0,4695	9,681	0,517

Tableau 5 : Résultats de ANOVA testant l'hypothèse nulle : les taux de HJ des abeilles de 7 et 14 jours ne varient pas en fonction de la race des jeunes abeilles (Race jeunes), de la race des butineuses âgées (race âgées), de l'âge et de la série.

III.2.1. Effet de la race des jeunes abeilles sur le taux de HJ

On considère l'effet de la race des jeunes abeilles, quelle que soit la race des butineuses âgées (figure 9).

- A 7 jours comme à 14 jours, les abeilles de la race *ligustica* possèdent le taux le plus élevé de HJ comparativement aux abeilles de la race *caucasica* et *mellifera*.

Dans les colonies contenant les butineuses âgées : à 7 jours, cette différence apparaît entre les *ligustica* et les *caucasica* (test de Fisher : Diff. Moy=-19.63 Diff. Crit.=14.85, P = 0.01).

A 14 jours *A. m. ligustica* présente des quantités de HJ supérieures aux deux autres races : 86ng/μl/abeille *ligustica* contre 43ng/μl/abeille *caucasica* (test de Fisher : P<0.0001) et contre 66 ng/μl/abeille *mellifera* (test de Fisher : P = 0.006).

Ce phénomène est encore plus marqué en comparant les colonies sans butineuses âgées : à 7 et à 14 jours, *ligustica* possède une quantité significativement plus grande de HJ par rapport aux deux autres races. Ainsi à 7 jours, chaque *ligustica* possède en moyenne 61ng/μl contre 34ng/μl chez les *caucasica* (test de Fisher, P = 0.04) et contre 27 ng/μl chez les *mellifera* (test de Fisher, P = 0.01). A 14 jours : *ligustica* possède en moyenne 71ng/μl/abeille alors que les *caucasica* en ont seulement 24ng/μl/abeille (P=0.0002) et les *mellifera* 21ng/μl/abeille (P=0.0001).

-Seules les abeilles *ligustica*, dans les colonies avec butineuses âgées, présentent une augmentation significative du taux de HJ entre 7 et 14 jours (test de Fisher, Diff. Moy.=-20.5, Diff. Crit.=17.68, P = 0.03). Chez cette même race mais placée cette fois-ci dans les colonies sans butineuses âgées, il n'y a pas de différence significative du taux de HJ en fonction de l'âge (test de Fisher, Diff. Moy.=-10.25, Diff. Crit.=33.4, P=0.54).

-Chez les *mellifera* le taux de HJ est significativement plus bas dans les colonies témoins que dans les colonies avec butineuses à 7 jours (test de Fisher, Diff. Moy.=23.7 Diff. Crit.=21.3, P=0.03) et à 14 jours (test de Fisher, Diff. Moy.=44.7 Diff. Crit.=22.8, P<0.0001).

Chez les jeunes *caucasica* à 7 et à 14 jours, il n'y a pas de différence significative entre les deux types de colonies (avec ou sans butineuses âgées) : à 7 jours (P=0.3) et à 14 jours (P=0.05). cependant, on observe une tendance similaire à *mellifera*, le taux de HJ est plus bas dans les colonies sans butineuses âgées.

Les taux de HJ des *ligustica* ne sont pas différents entre les abeilles des colonies avec butineuses et celles des colonies sans butineuses à 7 jours (P=0.7) et à 14 jours (P=0.2).

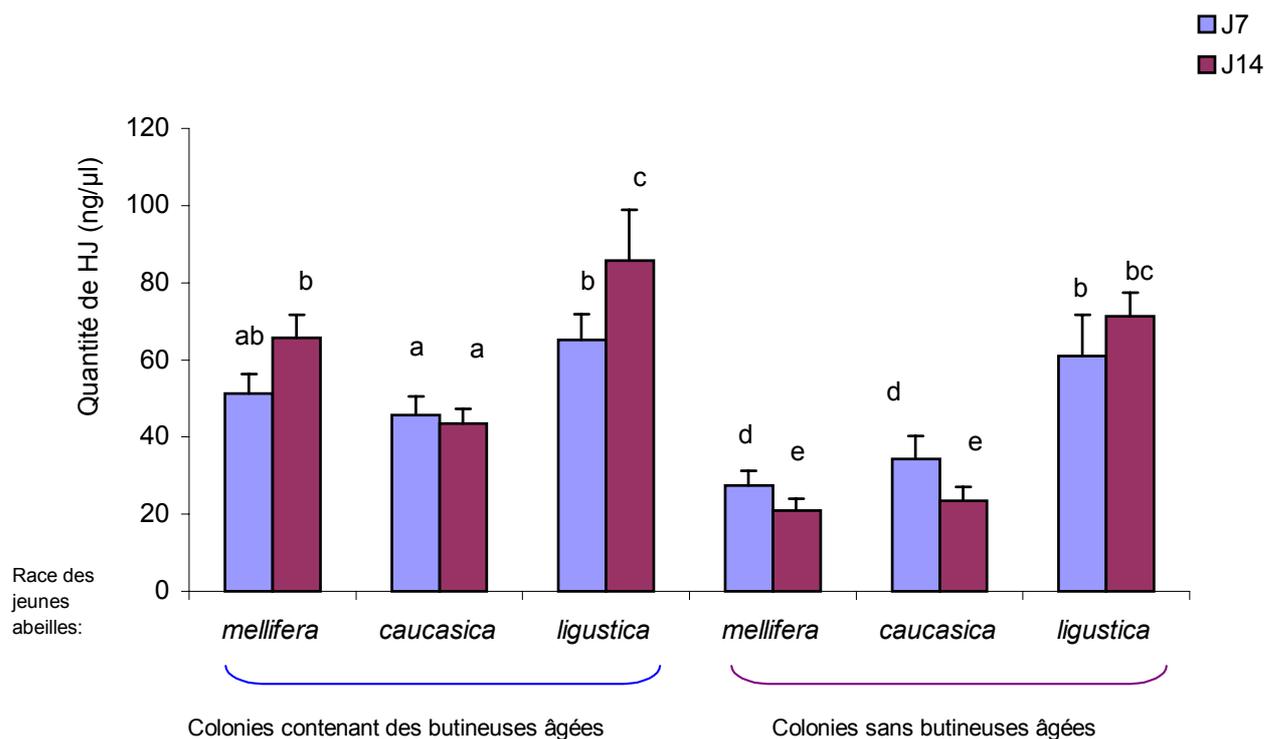


Figure 9 : Effet de la race des jeunes abeilles sur leur taux d'hormone juvénile (HJ) à 7 et 14 jours.

Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre deux groupes (test de Fisher au seuil de 5 %).

III.2.2. Effet de la race des butineuses âgées sur le taux de HJ des jeunes abeilles

On considère l'effet de la race des butineuses âgées, quelle que soit la race des jeunes abeilles (voir figure 10).

-Si on considère les trois races de butineuses âgées, une seule différence significative de HJ apparaît à 7 jours entre les colonies de butineuses âgées *caucasica* et les colonies butineuses âgées *ligustica* (test de Fisher, Diff. Moy. = 22.2, Diff. Crit. = 14.9, P = 0.003). En revanche, à 14 jours, il n'existe pas de différence significative de HJ des abeilles entre les colonies des 3 races de butineuses âgées : *caucasica* comparé à *ligustica* (Diff. Moy. = -9.8, Diff. Crit. = 14.9, P = 0.2), *caucasica* comparé à *mellifera* (Diff. Moy. = -2.7, Diff. Crit. = 14.9, P = 0.7) et *ligustica* comparé à *mellifera* (Diff. Moy. = 7.1, Diff. Crit. = 14.9, P = 0.3).

-Si on compare les colonies avec butineuses âgées et les témoins, les taux de HJ sont plus bas dans les colonies témoins à 7 et à 14 jours. A 7 jours, le taux de HJ des abeilles est significativement plus bas dans les colonies témoins que dans les colonies avec des butineuses âgées *caucasica* (test de Fisher, Diff. Moy. = 24,4 Diff. Crit. = 14,9, P = 0.001). A 14 jours, une différence significative apparaît entre les abeilles des colonies témoins et les abeilles dans les trois types de colonies avec butineuses. Les abeilles dans les colonies témoins renferment moins de HJ :

contrôle / colonie *ligustica* (Diff. Moy.=32.1, Diff. Crit.=15, P<0.0001)

contrôle / colonie *caucasica* (Diff. Moy.=22.2, Diff. Crit.=15, P=0.004)

contrôle / colonie *mellifera* (Diff. Moy.=25, Diff. Crit.=15, P=0.001)

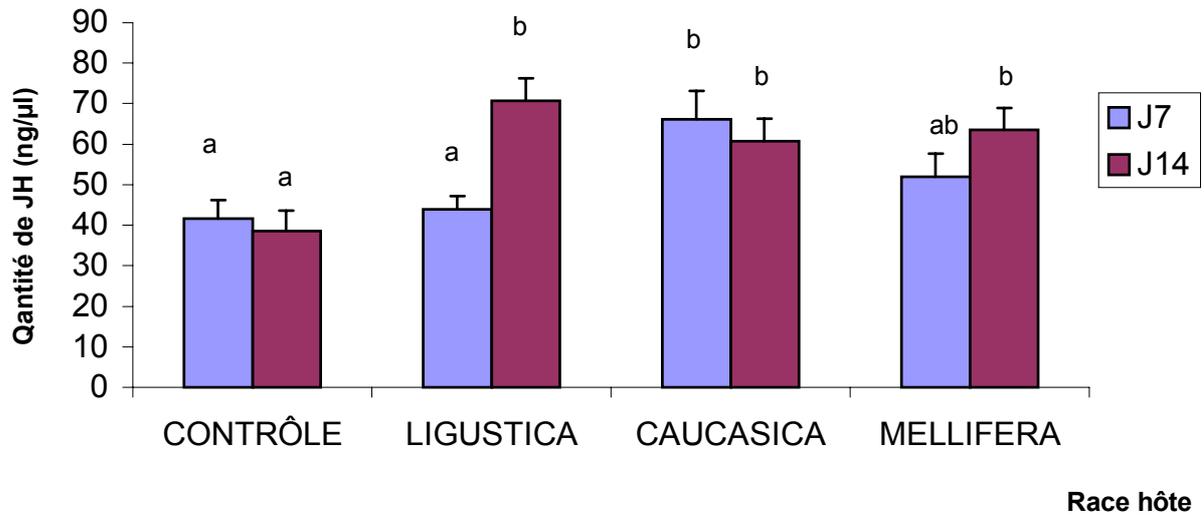


Figure 10 : Effet de la race des butineuses âgées (race hôte) sur le taux de JH des ouvrières de 7 et 14 jours.

Contrôle = colonies sans butineuses âgées.

Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les deux groupes (test de Fisher au seuil de 5 %).

IV. Discussion

Dans cette étude nous avons montré des différences d'âge au butinage entre trois races européennes d'*Apis mellifera* L. (*A.m. ligustica*, *A.m. caucasica* et *A.m. mellifera*). Parmi celles-ci, *ligustica* a le développement comportemental le plus rapide et possède l'effet inhibiteur le plus important sur le développement des jeunes ouvrières.

Ces résultats obtenus dans nos conditions expérimentales confirment ceux des expériences de Brillet *et al.* (2002) réalisées avec des colonies typiques. Toutefois une différence existe entre ces deux études ; ici un seul facteur connu pour ralentir le développement comportemental a été testé, l'inhibition exercée par les butineuses. En effet, nos petites colonies ne contiennent ni vrai couvain ni vraie reine, sécrétant tous deux des phéromones inhibitrices du développement des ouvrières (Pankiw *et al.*, 1998 ; Le Conte *et al.*, 2001) mais elles ont reçu chacune des quantités homogènes de ces deux phéromones de synthèse.

Brillet *et al.* (2002) attribue la découverte de la précocité de la race *ligustica* à des variations génétiques portant notamment sur la production de l'hormone juvénile ou sur la sensibilité des abeilles à cette hormone. Ici nous avons analysé le taux de HJ des trois races d'abeilles ; il apparaît que les *ligustica* présentent effectivement le taux le plus élevé et que cette quantité augmente de 7 jours à 14 jours, ce qui confirme bien l'hypothèse de Brillet *et al.* (2002).

Les butineuses âgées *ligustica* exercent l'effet inhibiteur le plus important sur le développement comportemental des jeunes abeilles quelle que soit la race de ces dernières. Mais cette inhibition agit de la façon la plus significative sur les jeunes ouvrières de leur propre race. Cependant cette influence inhibitrice intraspécifique ne se retrouve pas chez les deux autres races.

Un autre point souligné par cette étude est que les abeilles des trois races butinent plus tôt dans les colonies témoins, sans butineuses, que dans les colonies qui en contiennent,

quelle que soit la race des butineuses. Ces résultats corroborent ceux de Huang et Robinson (1992, 1996, 1998) montrant le rôle inhibiteur des butineuses sur l'âge au butinage des autres ouvrières de la colonie. Mais là encore, contrairement à l'inhibition exercée par les butineuses âgées *ligustica*, celle des *caucasica* et des *mellifera* sur les jeunes individus de leur propre race ou sur les jeunes *ligustica* est très faiblement significative.

Winston et Katz (1982) ont comparé l'âge au butinage de deux races d'abeilles : *Apis mellifera ligustica* et *A. m. scutellata* (abeilles d'origine africaine introduite en Amérique du Sud, dites abeilles « africanisées »). Des introductions croisées suggèrent que dans leur propre colonie, les abeilles « africanisées » commencent à butiner plus tôt que les abeilles *ligustica*. En revanche, dans les sociétés *ligustica*, elles sortent plus tard que dans leurs colonies d'origine. Par contre, des *ligustica* placées dans des colonies africanisées sont plus précoces au butinage que les ouvrières de la race indigène.

Afin d'expliquer ces résultats ces auteurs ont émis l'hypothèse que le seuil de sensibilité aux stimuli incitant au butinage est plus élevé dans les colonies « africanisées », et que les ouvrières de cette race possèdent un seuil de sensibilité plus élevé. Si nous raisonnons en terme d'inhibition comme Huang et Robinson (1992, 1996) et non pas en terme de stimulation comme Winston et Katz (1982), nous pouvons interpréter les résultats de ces auteurs de la façon suivante : moins inhibées dans leurs propres colonies, les jeunes abeilles « africanisées » seraient plus sensibles à l'inhibition que les *ligustica*, dont les butineuses sont fortement inhibitrices. Les jeunes *ligustica*, en revanche, sont beaucoup plus précoces dans les colonies africanisées car non seulement elles sont moins sensibles à l'inhibition mais les butineuses africanisées sont aussi moins inhibitrices.

Nos résultats, qui mettent l'accent sur la forte inhibition des *ligustica* sur les ouvrières plus jeunes, peuvent ainsi être mis en accord avec ceux de Winston et Katz (1982).

La corrélation entre le taux de HJ et le développement comportemental des abeilles est confirmée seulement pour la race *ligustica*. En effet, si on compare les trois races, les abeilles *ligustica* sont les plus précoces au butinage, et elles présentent également le taux le plus élevé de HJ à 7 et 14 jours. Les abeilles des deux autres races,

caucasica et *mellifera*, ne montrent aucune différence significative de quantité de HJ en fonction de l'âge.

Mais nos résultats ne mettent pas en évidence un quelconque effet des butineuses âgées sur le taux de HJ des plus jeunes.

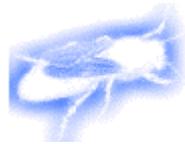
De plus, dans les colonies témoins, alors que les jeunes abeilles butinent plus tôt, elles possèdent moins de HJ que dans les colonies avec butineuses, ceci quelle que soit la race des butineuses. Ce résultat indique que l'HJ ne serait pas le seul facteur impliqué dans la régulation du développement comportemental des abeilles.

Il est donc bien en accord avec le modèle sur l'inhibition sociale (Beshers et Fewell, 2001). En effet, ce modèle décrit l'un des mécanismes de régulation du développement comportemental des jeunes individus de la société : le pouvoir inhibiteur des butineuses âgées. Il succède à l'ancien modèle " activateur-inhibiteur " qui prenait en compte un second facteur, incitateur du développement comportemental, l'HJ (Huang et Robinson, 1992). Or des travaux plus récents ont montré que l'HJ n'est pas nécessaire à la régulation du développement comportemental (Sullivan *et al.*, 2000, Le Conte *et al.*, 2001). Nos expériences viennent renforcer ces résultats et contribuent à valider le modèle de l'inhibition sociale chez la race *ligustica*.

Dans les études qui vont suivre, nous avons tenté d'identifier cette inhibition sociale chez les abeilles *Apis mellifera ligustica*.

Partie 3

Inhibition comportementale ?



I. Objectif et principe de l'étude

Avant de commencer nos expériences comportementales pour caractériser l'inhibition sociale, nous cherchons à savoir si l'inhibition peut s'exprimer dans nos conditions expérimentales. Valider notre protocole, nous permettrait de disposer d'un test comportemental fiable. Pour cela, nous avons mis en présence des butineuses et des abeilles émergentes dans des petites ruches sur le terrain. Si les jeunes ouvrières sont inhibées par les butineuses, elles iront butiner plus tard que des abeilles témoins placées dans des colonies sans butineuses.

Une fois ces observations vérifiées, nous tentons de caractériser la nature de l'inhibition sociale. Deux hypothèses ont été envisagées. Le signal inhibiteur pourrait être mécano sensoriel, associé à un comportement tel que les échanges antennaires, le transfert de nourriture ou le léchage.

Nous pouvons également supposer que l'inhibition serait volatile, c'est-à-dire que les ouvrières âgées pourraient inhiber le développement des plus jeunes sans rentrer en contact physique avec ces dernières.

Pour tester ces deux hypothèses, des expériences d'observations du comportement des abeilles en ruche vitrée ont été entreprises visant à mettre en évidence d'éventuelles interactions sociales spécifiques entre les butineuses et les ouvrières plus jeunes.

II. Observation de l'inhibition exercée par les butineuses sur le butinage précoce de jeunes ouvrières

La première étape de nos recherches consiste à observer l'inhibition sociale exercée par les butineuses dans nos conditions expérimentales

II.1. Matériel et méthodes

Dans les expériences précédentes de comparaison du développement comportemental des trois races d'*Apis mellifera* L., nous avons mis en évidence l'effet inhibiteur exercé par les butineuses chez la race *ligustica*. Nous avons donc utilisé des abeilles *Apis mellifera ligustica* dans toutes nos expériences pour identifier cet inhibiteur.

Cette expérience s'est déroulée sur deux années. En septembre 1999, deux séries ont été réalisées. Une colonie à double cohorte contenant 600 abeilles émergentes et 600 butineuses est comparée à une colonie témoin, colonie à simple cohorte formée de 1200 abeilles émergentes (voir détail du protocole dans Partie 2 II.2.).

En 2000, trois séries ont été effectuées en comparant cette fois-ci, une colonie à double cohorte composée de 1100 abeilles émergentes et de 400 butineuses et une colonie à simple cohorte, témoin, contenant 1500 abeilles émergentes.

Les abeilles émergentes sont marquées sur le thorax par un point de peinture lorsqu'elles ont un jour de vie adulte pour être distinguées des butineuses. C'est le développement comportemental de ces abeilles marquées qui est observé.

Le critère de développement comportemental pris en compte est l'âge du premier jour de butinage des abeilles marquées. Deux fois par jour (matin et après-midi), l'entrée de chaque *nucleus* est fermée pendant 30 min à l'aide d'une grille. Puis les nouvelles butineuses marquées pollen ou nectar qui tentent de rentrer dans la colonie sont dénombrées. (voir partie 2 II.3). Dans cette expérience, ainsi que dans toutes celles qui vont être décrites dans ce mémoire, chaque nouvelle butineuse qui est observée n'est pas éliminée mais elle est remarquée, sur l'abdomen de façon à ne pas être comptée deux fois. Les observations se poursuivent jusqu'à ce que les abeilles marquées atteignent 20 jours.

II.2. Résultats

Sur les graphes suivants, les pourcentages cumulés de nouvelles butineuses entre une colonie à double cohorte (contenant des jeunes abeilles et des butineuses) et une colonie à simple cohorte, témoin (renfermant aucune butineuse) sont comparés (voir figure 11).

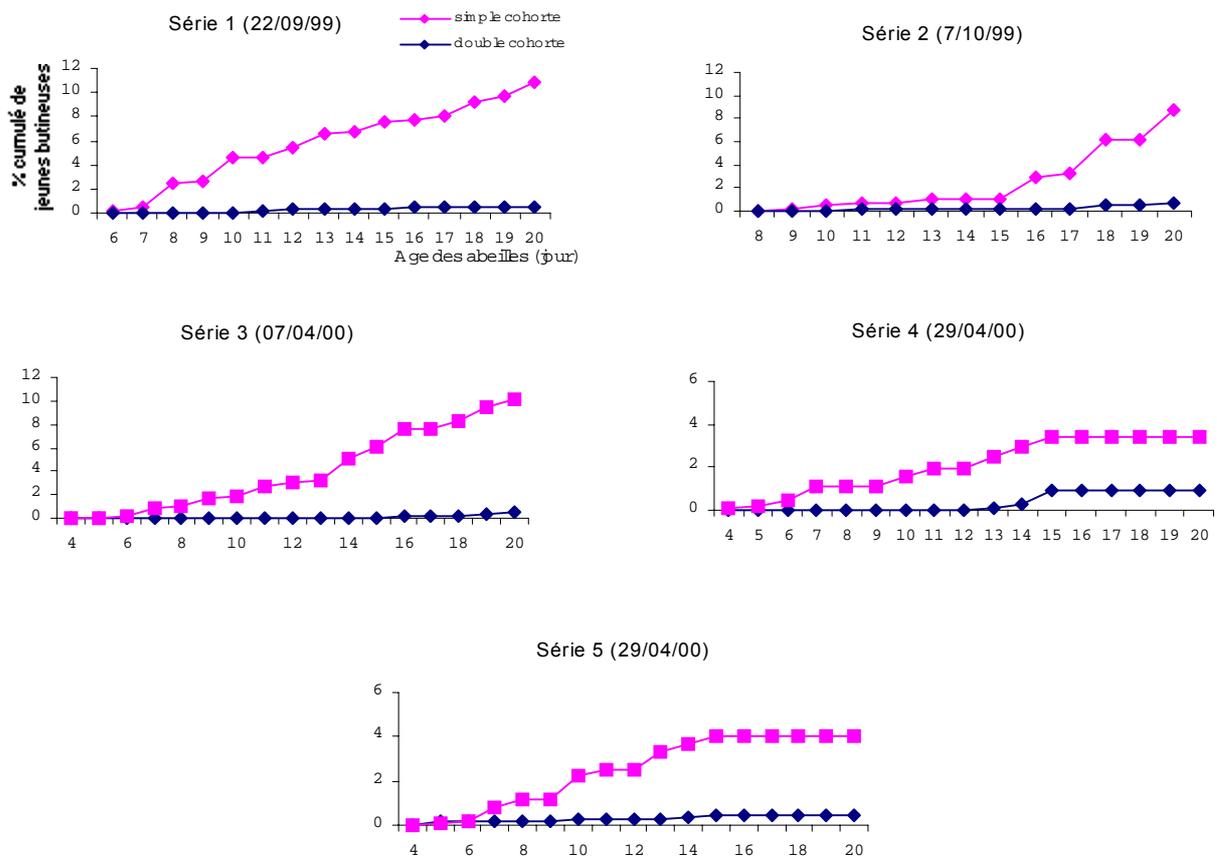


Figure 11 : Pourcentage cumulé de nouvelles butineuses dans les colonies avec butineuses âgées ou sans butineuses âgées.

Dans toutes les séries, ce sont les abeilles privées de la présence de butineuses qui partent butiner précocement. Lorsque les abeilles atteignent 20 jours, les différences sont très significatives : dans les colonies à double cohortes, un très petit nombre d'abeilles devient butineuses comparé aux colonies à simple cohorte (test de Mann-Whitney, $P=0.008$).

II.3. Discussion

Cette première expérience montre clairement l'effet inhibiteur des butineuses sur le butinage précoce des ouvrières plus jeunes, les proportions de nouvelles butineuses étant supérieures dans les colonies témoins. Ces résultats confirment des travaux précédents de Huang et Robinson (1992) qui soulignent l'importance des interactions ouvrières-ouvrières dans la régulation du développement comportemental.

Nous pouvons donc conclure que nos conditions expérimentales sont bien adaptées à l'étude de cette inhibition et constituent un bon test comportemental.

III. Interactions sociales spécifiques ?

La première étape de la caractérisation de l'inhibition sociale est de savoir si l'inhibition est comportementale. Pour cela, les comportements des abeilles émergentes en présence de butineuses sont observés en ruche vitrée et comparés à ceux d'abeilles émergentes placées en simple cohorte.

III.1. Matériel et méthodes

III.1.1. Colonies expérimentales

Les abeilles sont introduites dans une ruche vitrée ne comportant qu'un seul cadre de cire chargé de réserves alimentaires et un leurre de reine (QMP). Le cadre de cire est accessible aux abeilles seulement sur une face, pour concentrer tous les comportements sur un même côté. Ces ruches sont placées dans une pièce chauffée (25°C) et connectées à l'extérieur pour permettre aux abeilles de sortir butiner.

Une colonie, composée de 1000 abeilles émergentes marquées, âgées d'un jour, reçoit 100 butineuses âgées. Celles-ci ont été prélevées dans leur ruche d'origine *Apis mellifera* L. située à plus de 10 Km de l'emplacement de la ruche vitrée. Cette distance empêche le retour des butineuses vers leur nid d'origine.

50 abeilles émergentes sont marquées individuellement en collant sur leur thorax une pastille numérotée. Le nombre de butineuses est suffisant pour provoquer l'inhibition sociale car 30 butineuses peuvent inhiber le développement comportemental de 1000 jeunes ouvrières (Giray *et al.*, 1999).

Une colonie témoin renferme 1100 abeilles émergentes dont 50 sont numérotées. Les ruches restent fermées pendant les 5 premiers jours afin de favoriser les interactions sociales conformément aux travaux de Huang et Robinson (1996).

III.1.2. Observations des comportements

Les observations sont effectuées sur les abeilles numérotées. Un quadrillage de la face de la ruche vitrée permet de suivre le comportement de l'ensemble des abeilles. La phase d'observation s'achève lorsque tout le groupe d'abeilles numérotées a été analysé. Les observations se font visuellement et les différents comportements étudiés sont inclus dans un éthogramme (voir tableau 6).

(1) Insp cellule	inspection cellulaire
(2) Contact ant	contact antennaire
(3) VDV	vibration dorso-ventrale
(4) Trophallaxie	trophallaxie
(5) Tête dans cel.	tête dans une cellule
(6) Marche	marche sur la cire
(7) Marche vite	marche vite sur la cire
(8) Immobile	immobile sur la cire
(9) Autonet.	auto nettoyage

Tableau 6 : Ethogramme des ouvrières placées en colonies double cohorte ou en colonie simple cohorte.

Les observations sont réalisées entre deux et quatre fois par jour et le nombre total d'abeilles observées est calculé. Les résultats bruts sont donnés en annexe.

III.1.3. Mesure du développement comportemental

Afin de mettre en évidence l'inhibition des butineuses sur le développement comportemental des jeunes, on prend en compte l'âge au butinage des abeilles marquées. Pour cela, on observe deux fois par jour (matin et après-midi) le butinage des abeilles marquées à partir du jour de l'ouverture vers l'extérieur des ruches vitrées, c'est-à-dire le sixième jour de l'expérience (après 5 jours de confinement). Après avoir obstrué l'entrée pendant 30 min, les butineuses marquées qui tentent de rentrer dans la ruche sont dénombrées et remarquées sur l'abdomen de façon à ne pas être comptées deux fois (voir partie 3.II.1). L'expérience est arrêtée lorsque 50 butineuses ont été observées. Des résultats antérieurs ont montré que l'âge moyen des 50 premières butineuses d'une cohorte de 500 ouvrières fournit un indice satisfaisant du développement comportemental de la cohorte entière (Robinson, 1987 ; Robinson *et al.*, 1989 ; Giray *et al.*, 2000).

III.1.4. Analyses statistiques

Les résultats des observations des comportements ont été exploités grâce au logiciel STATOS élaboré par le Professeur M. Roux. Une analyse des co-structures dans le cadre de l'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) a également été employée pour traiter l'ensemble des comportements observés dans les différentes ruches sur plusieurs jours.

L'Analyse de co-structure (ou de co-inertie) (Mercier 1991, Chessel et Mercier 1993) étudie simultanément deux tableaux rectangulaires dont les lignes représentent les mêmes individus ou observations. Elle consiste à rechercher des axes factoriels qui mettent en relief soit les points communs aux deux tableaux étudiés (analyse de ressemblance), soit les points de désaccord entre les deux tableaux (analyse de

dissemblance). Dans cette méthode les deux tableaux jouent des rôles identiques ; aucun des tableaux n'est privilégié par rapport à l'autre. Les axes sont des combinaisons linéaires des variables des deux tableaux. Chaque axe est caractérisé par une paire de combinaisons linéaires : une pour le premier tableau et une autre pour le second tableau. Appliquées aux individus des deux tableaux ces combinaisons linéaires sont telles que, pour chaque axe, les deux séries de nombres obtenus aient une covariance maximum, avec la contrainte que les axes successifs soient non corrélés entre eux.

Comme dans une analyse factorielle ordinaire la solution du problème réside dans la recherche des vecteurs propres, et des valeurs propres associées, d'une matrice particulière. Les valeurs propres sont proportionnelles à l'intensité du lien (covariance) entre les deux séries de coordonnées portées par chaque axe. Cependant, contrairement à une analyse factorielle usuelle, certaines valeurs propres peuvent être négatives. Dans ce cas, les axes correspondants mettent en évidence les dissemblances entre les deux tableaux au lieu de leurs ressemblances (Cf. Torre 1996, p. 50 et p. 75).

Les comparaisons des moyennes d'âge au butinage entre les deux colonies sont analysées statistiquement par le test non paramétrique de Mann-Whitney.

III.2. Résultats

III.2.1. Observations des comportements

Les expériences ont été réalisées en avril et mai 2001. Elles comptent 3 répétitions.

Les observations des comportements des abeilles numérotées ont été traitées par des analyses de co-structures dans le cadre de l'AFC et sont représentés sur les graphes suivants (voir figures 12 à 14). Pour chaque série, deux nuages de points sont calculés. Le premier correspond à la meilleure représentation du nuage des comparaisons des comportements entre les deux ruches. Le second nuage de points correspond à la meilleure représentation des individus, c'est-à-dire la somme des abeilles numérotées exécutant un même comportement le même jour. Dans les trois cas, les graphes sont une représentation des axes 1 et 2 dont les valeurs propres sont négatives.

Pour chaque série, les valeurs propres négatives expliquent une plus grande partie de la covariance que les valeurs propres positives ; cela est visible plus globalement sur l'ensemble de toutes les valeurs propres car la « trace globale » est négative. On peut donc dire que les différences entre les deux groupes sont plus fortes que les ressemblances. Par conséquent, les deux nuages de points mettent en avant les différences entre les deux ruches. Les traces globales des séries 1, 2 et 3 sont respectivement : -0.266, -0.2307, -0.3431.

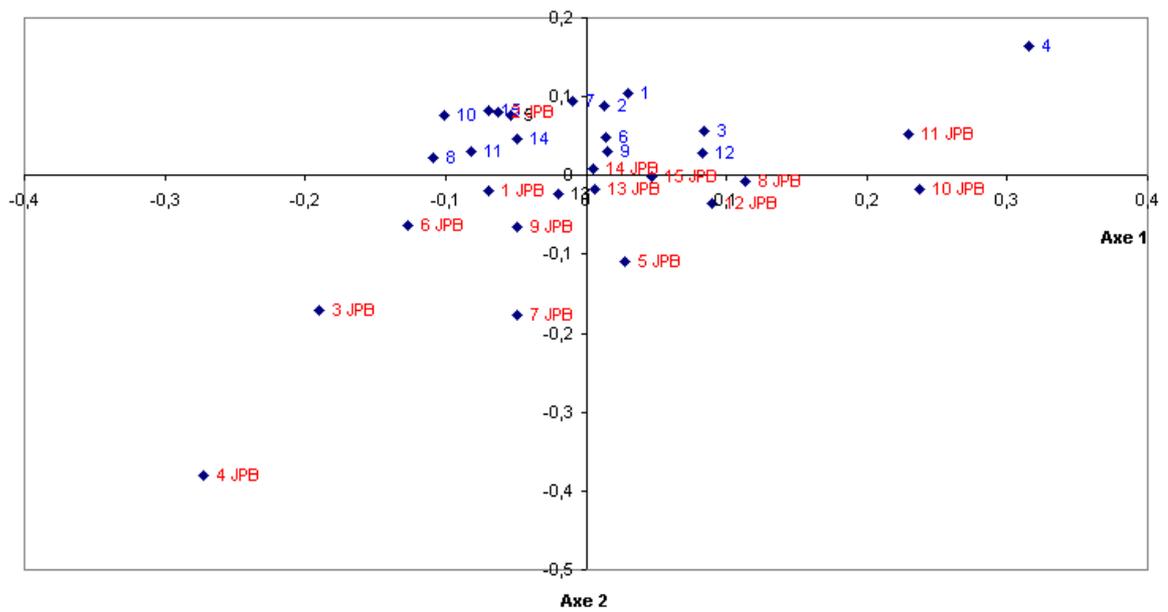
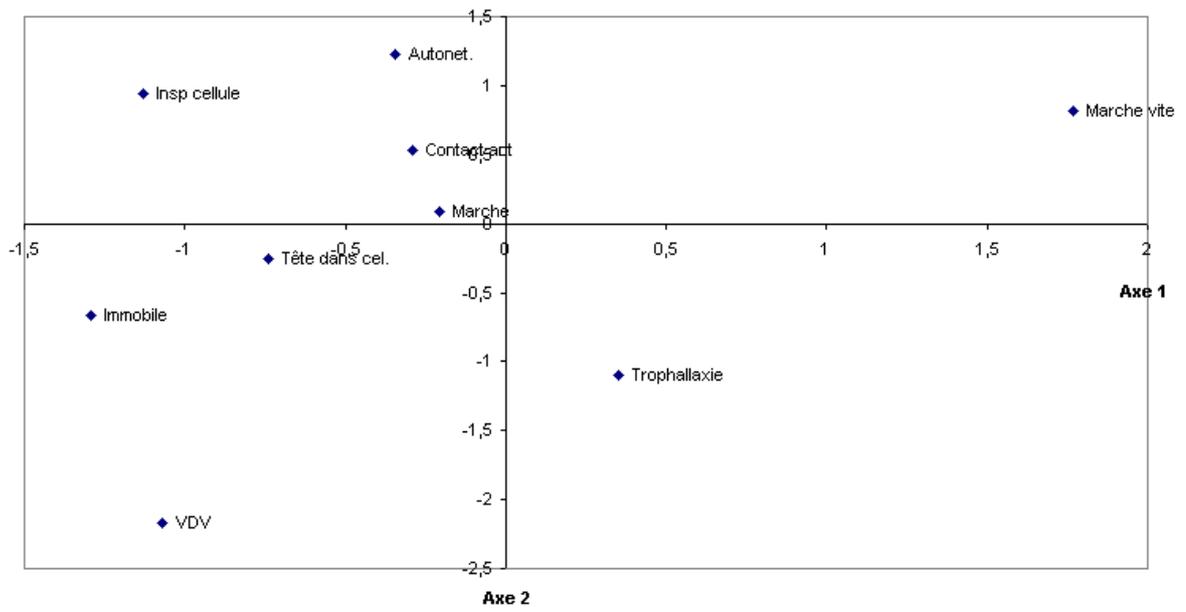


Figure 12 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 1

JPB= jeunes ouvrières en présence de butineuses

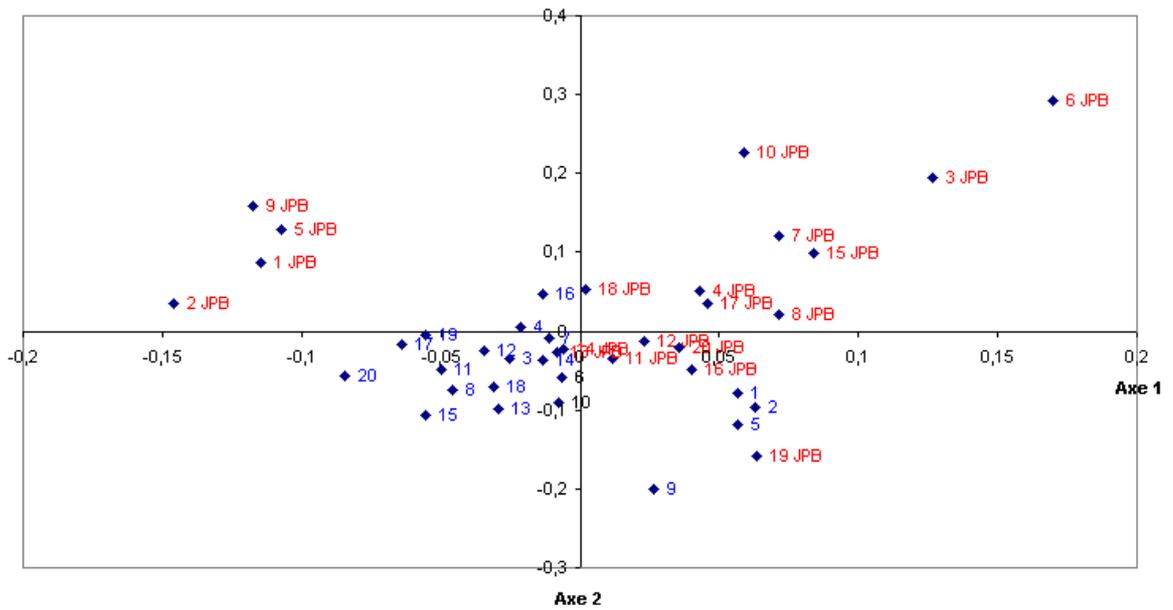
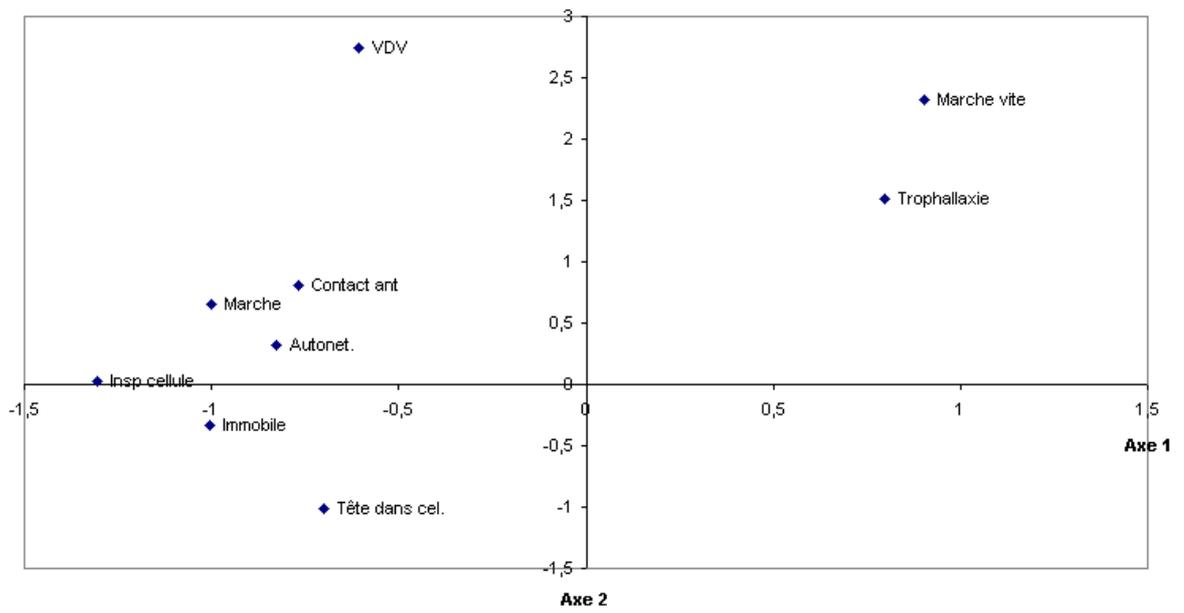


Figure 13 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 2

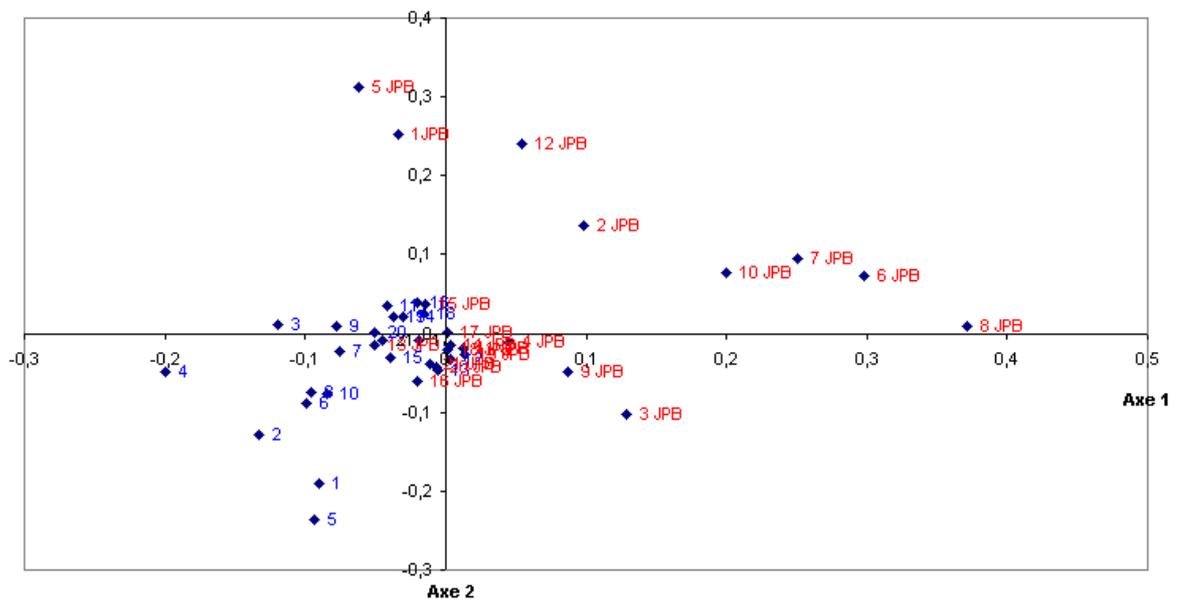
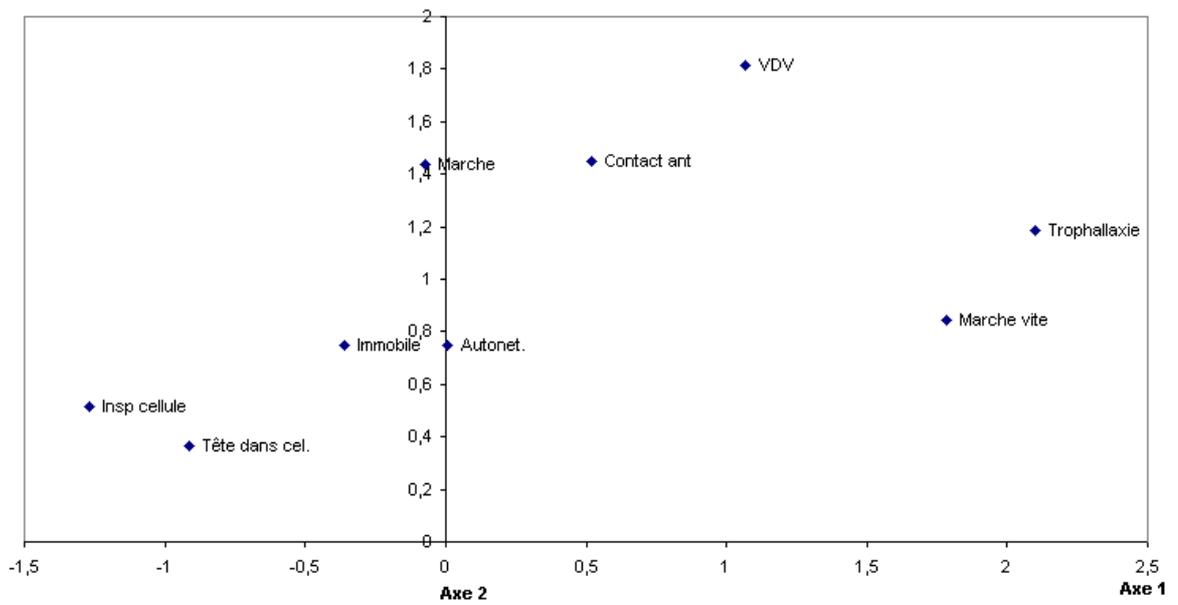


Figure 14 : Graphe de l'AFC des co-structures pour la série 3

Dans les trois séries, on caractérise donc les différences de comportements des jeunes ouvrières placées en présence de butineuses (abeilles âgées) ou non.

Au niveau des comportements, l'axe 1 possède la plus grande valeur propre et donc renferme le maximum d'information. Dans les trois séries, il semble être représenté par les points : "Insp cellule", "Immobile" et "Tête dans cel." du côté négatif de l'axe. Quant au côté positif de l'axe 1, il serait représenté par les points "Trophallaxie" et "Marche vite". Ces comportements très corrélés avec l'axe 1 peuvent être considérés comme des indicateurs des différences entre les deux groupes d'individus.

Si on considère le nuage des observations, deux groupes se distinguent nettement. Alors que les JPB (qui correspondent aux Jeunes ouvrières en Présence de Butineuses) s'étalent sur l'axe 1, les points bleus qui sont les observations des jeunes abeilles entre elles se concentrent autour du centre des deux axes. Ces points sont en fait des dates d'observations, dans les séries 1 et 2, il semble qu'une majorité de dates JPB soit plus faible du côté négatif de l'axe 1 (1 JPB, 3 JPB, 4 JPB) alors que les dates plus élevées se retrouvent du côté positif de l'axe (10 JPB, 11JPB pour la série 1 et 15 JPB ou 19 JPB dans la série 2). Sur l'axe 1, un gradient temporel semble donc ressortir pour le groupe des jeunes en présence de butineuses. Le coefficient de corrélation de rangs de Spearman, calculé entre les rangs des coordonnées sur le premier axe factoriel et le numéro de l'observation, permet de vérifier l'existence de ce gradient temporel. Pour la série 1, la valeur du coefficient de corrélation de Spearman est : $r = 0.65$. Or pour les 15 observations, la valeur critique au risque 5 % est 0.525. Le résultat est donc significatif, il semble bien y avoir une liaison entre la date d'observation et les coordonnées sur le premier axe. En revanche, le coefficient dans la série 2 ne donne pas de résultat significatif : $r = 0.11$ et la valeur critique (pour $n = 20$) au risque de 5 % : 0.45. Le résultat dans la troisième série est plus proche de la significativité à 5 % : $r = 0.36$ et valeur critique ($n = 21$) : 0.438.

Un gradient temporel des comportements des jeunes ouvrières en présence de butineuses âgées semble se dessiner sur les graphes même si le coefficient de Spearman ne donne pas un net résultat significatif dans chacune des séries.

III.2.2. Mesure de l'âge moyen au butinage des colonies

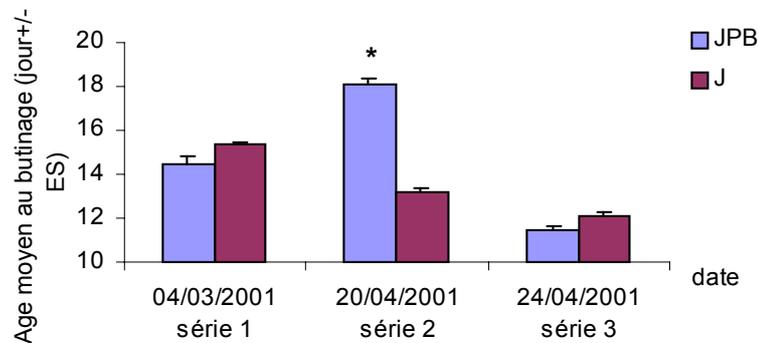


Figure 15 : Age moyen au butinage des jeunes ouvrières.

JPB = colonie contenant les jeunes abeilles en présence de butineuses âgées

J = colonie contenant uniquement de jeunes abeilles

* indique des différences statistiques entre les deux groupes par le test de Mann-Whitney au seuil de 5%.

Une série sur trois montre un retard de l'âge moyen au butinage des abeilles émergentes qui sont au contact des butineuses par rapport aux jeunes ouvrières témoins privées de tout contact avec des individus plus âgés. Ce retard est très important car il atteint 5 jours (l'âge moyen étant de 18.1 jours pour les abeilles en présence de butineuses contre 15.3 jours pour les témoins). Cette différence est très significative statistiquement, $P < 0.0001$. En revanche, dans les deux autres séries, les âges moyens au butinage ne sont pas significativement différents entre les deux colonies, et on constate même une légère accélération de l'âge au butinage chez le groupe d'abeilles en présence de butineuses.

III.3. Discussion

Un problème essentiel ressort de ces expériences : l'effet inhibiteur des butineuses âgées sur la précocité au butinage des jeunes ouvrières n'est observé seulement dans une série sur trois. En effet, dans la première et la dernière séries, les abeilles butinent au même âge dans les colonies contenant ou non des butineuses âgées. Si l'inhibition sociale n'est pas mise en évidence dans nos conditions expérimentales, la recherche d'éventuelles interactions spécifiques entre jeunes abeilles et butineuses âgées pouvant être impliquées dans cette inhibition semble vaine.

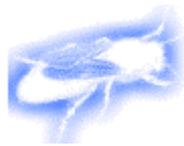
Cependant, dans la série 2 où l'inhibition sociale s'exprime, les comportements des abeilles émergentes placées en présence de butineuses âgées sont différents de ceux des jeunes abeilles privées de tout contact avec des butineuses âgées. En effet, dans les colonies contenant les abeilles émergentes et les butineuses, les plus jeunes ouvrières vont au cours du temps passer d'un état immobile vers une marche rapide. Un gradient temporel semble ressortir sur le premier axe qui correspond au facteur d'immobilité et de rapidité de marche sur la cire. Autrement dit, les jeunes abeilles au contact des butineuses sont de plus en plus agitées au cours du temps alors que les abeilles témoins restent calmes et regroupées. Les abeilles butineuses privées de tout environnement extérieur semblent dans un état de stress qu'elles communiqueraient aux plus jeunes ouvrières. Toutefois, aucune interaction comportementale spécifique entre jeune ouvrière et butineuse âgée n'a pu être mise en évidence lors de ces expériences d'observations comportementales.

Notre première hypothèse d'une inhibition sociale associée à un comportement n'a pas été vérifiée dans nos conditions d'analyses. Toutefois, ceci ne signifie pas que l'inhibition n'est pas comportementale ou liée en partie à un comportement.

Nous avons ensuite testé la seconde hypothèse : si l'inhibition n'est pas comportementale, elle peut être chimique. Dans ce cas, est-elle transmise par des molécules volatiles ou par contact entre les individus.

Partie 4

Inhibition chimique de contact ou volatile ?



I. Objectif et principe de l'étude

Nous testons la seconde hypothèse sur la nature de l'inhibition sociale : l'inhibition est chimique. Dans ce cas, met-elle en jeu des molécules volatiles ou non volatiles ?

Pour répondre à cette question, nous avons constitué une colonie contenant un groupe d'abeilles émergentes séparé d'un lot d'ouvrières âgées par une grille suffisamment épaisse pour empêcher tout contact physique mais qui laisse diffuser les molécules. Cette colonie est comparée à une colonie regroupant les deux même lots d'abeilles mais séparés cette fois-ci par une grille permettant les contacts physiques. L'âge moyen au butinage des jeunes abeilles dans chacune de ces conditions expérimentales permettra de mettre en évidence si l'inhibition sociale s'est maintenue malgré l'absence de contact entre les deux groupes.

II. Matériel et méthodes

II.1. Colonies expérimentales

Nous avons utilisé des *nuclei* composés de deux compartiments identiques qui possèdent chacun leur propre ouverture permettant aux abeilles de sortir et d'entrer. Chaque compartiment va loger 1000 abeilles (émergentes ou butineuses). La paroi centrale a été découpée et remplacée par une grille. Cette grille sépare donc les deux compartiments contenant chacun une cohorte d'abeilles. Chaque compartiment est composé d'un leurre de reine et de deux cadres bâtis, l'un chargé de miel et le second vide.

Les butineuses sont prélevées dans leur colonie mère et sont directement aspirées dans le compartiment de la ruche expérimentale à l'aide d'un aspirateur portatif. Les abeilles émergentes proviennent de cadres de couvain prélevés dans des colonies la veille et placés dans une étuve (pour plus de détails, voir partie 2 chapitre II.2).

Les abeilles sont marquées le premier jour de leur vie adulte et seront observées au cours de l'expérience.

Après l'introduction des abeilles, émergentes et butineuses, dans leurs compartiments respectifs, les ruchettes sont laissées dans une pièce à l'obscurité pendant 2 jours. Le troisième jour, elles sont mises sur le terrain et le compartiment contenant les butineuses est ouvert. Le jour suivant les abeilles émergentes sont libérées à leur tour (voir figure 15).

II.2. Traitements

Différents types de ruchettes ont été construits (voir figure 16) :

1- une grille simple a été placée entre les deux compartiments, l'un renfermant 1000 abeilles émergentes marquées et l'autre 1000 butineuses. Ce type de grille permet les contacts physiques entre les deux groupes, tels que la trophallaxie, le léchage et les contacts antennaires (figure 16 : colonie 1).

2- une colonie témoin renferme de chaque côté de la grille simple deux lots de 1000 abeilles émergentes (un lot est marqué) (figure 16 : colonie 2).

3- une grille double empêche tout contact entre 1000 abeilles émergentes placées dans un compartiment et 1000 butineuses placées dans l'autre partie de la ruchette. En effet, l'espace entre les deux grilles atteint environ 20mm, ce qui est largement supérieur à 2 fois la longueur moyenne du proboscis d'une ouvrière, en moyenne 6.7mm (*Apis mellifera ligustica*, Goetze, 1940 dans Ruttner, 1968) (figure 16 : colonie 3).

4- une colonie témoin renferme de chaque côté de la grille double 1000 abeilles émergentes (un lot est marqué) (figure 16 : colonie 4).

5- une autre colonie témoin comporte un trou entre les deux compartiments à la place de la grille, les deux cohortes d'abeilles (1000 abeilles émergentes et 1000 butineuses) peuvent se mélanger, donc rien ne s'oppose plus à ce que les ouvrières rentrent librement en contact (figure 16 : colonie 5).

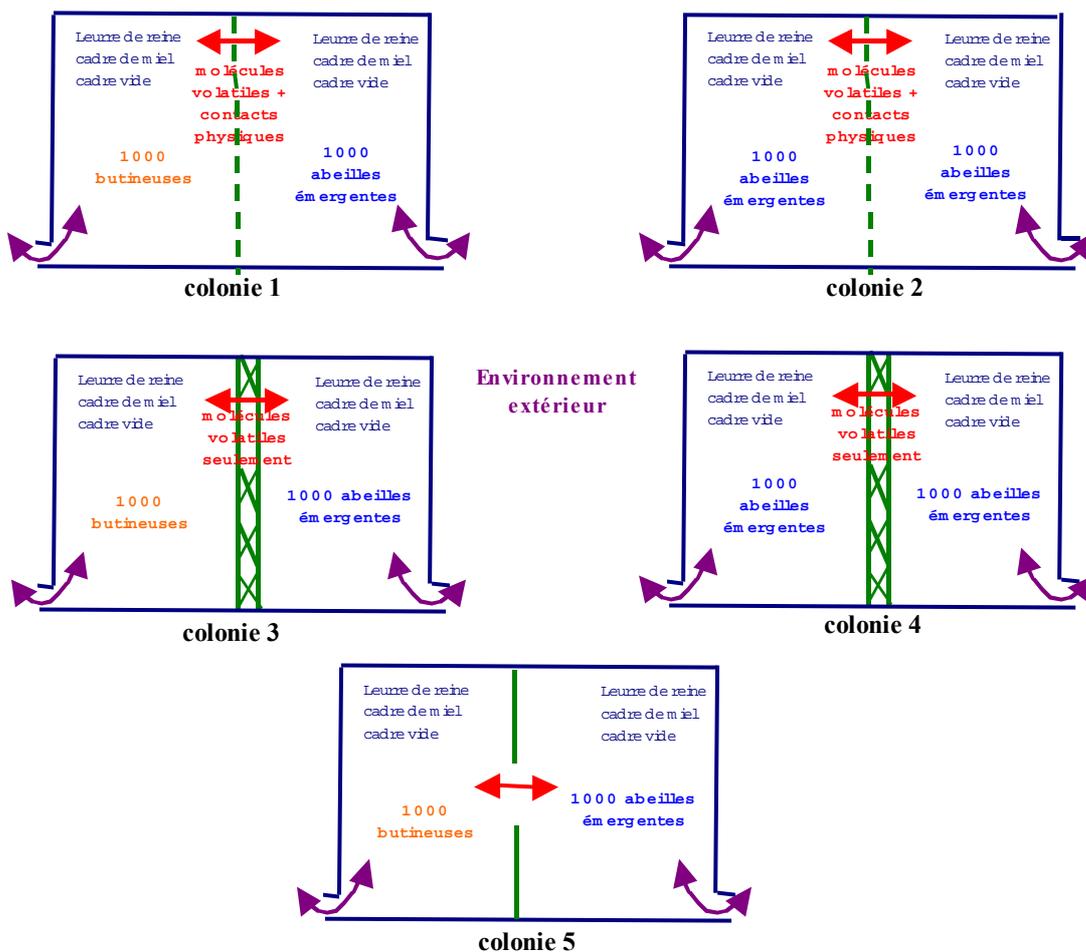


Figure 16 : Schéma du protocole de l'expérience sur la séparation des abeilles avec des grilles simples ou doubles.

II.3. Mesure du développement comportemental

Le rythme de développement comportemental est mesuré en déterminant l'âge au butinage des abeilles marquées. Le protocole d'observation des nouvelles butineuses est similaire à celui décrit dans la partie 2, chapitre II.3. Mais dans le cas présent, chaque ruche comporte deux compartiments, chacun ayant sa propre entrée. Les deux entrées sont donc fermées et les observations sont réalisées pour chaque compartiment jusqu'à

l'obtention des 50 premières jeunes butineuses de chaque colonie (pour plus de détails, voir partie 3, II.1.3.).

Les expériences ont été conduites au cours de mai à juillet 2001, elles correspondent à quatre répétitions.

II.4. Analyses statistiques

L'effet des extraits d'abeilles sur le développement comportemental des ouvrières a été analysé par une analyse de variance sur les données transformées : $\log X$. En effet, les variances n'étant pas homogènes, les données brutes ont subi une transformation logarithmique afin d'obtenir la condition d'homoscédasticité requise pour effectuer le test d'analyse de la variance (Sokal et Rolf, 1995). Le test PPDS de Fisher au seuil de 5% permet de réaliser les comparaisons deux à deux. Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel StatView.

III. Résultats

Le graphe ci-dessous représente les moyennes de l'âge au butinage des abeilles pour les quatre répétitions.

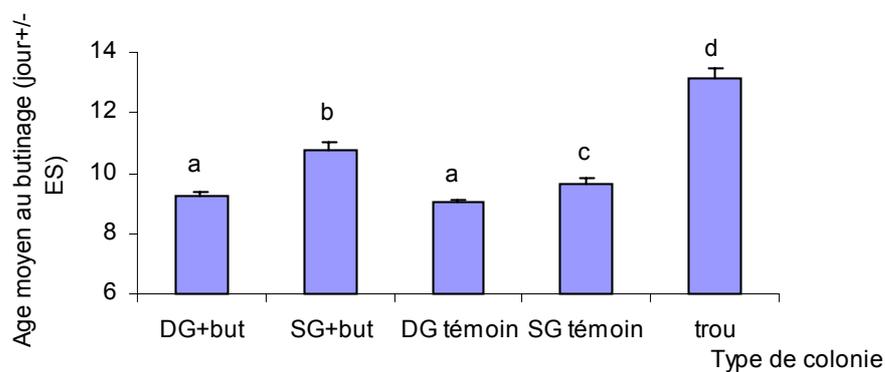


Figure 17 : Effet de la séparation entre butineuses et abeilles émergentes par une simple grille ou une double grille sur l'âge au butinage des abeilles émergentes.

DG+but = un compartiment contient 1000 abeilles émergentes marquées et l'autre 1000 butineuses. Ils sont séparés par une double grille (DG).

SG+but = les abeilles émergentes et les butineuses sont séparées par une grille simple (SG).

DG témoin = les deux compartiments contiennent chacun 1000 abeilles émergentes et sont séparés par une grille double.

SG témoin = les deux compartiments contiennent chacun 1000 abeilles émergentes et sont séparés par une grille simple.

Trou = 1 compartiment contient 1000 abeilles émergentes marquées et l'autre 1000 butineuses, il n'y a aucune séparation entre les deux (la paroi commune est trouée).

Les lettres différentes indiquent une différence significative par ANOVA sur logx au seuil 1%.

Des différences significatives existent entre les âges moyens au butinage des colonies qui sont séparées par une ou deux grilles (ANOVA, $F = 40.703$, $ddl = 4$, $P < 0.0001$).

	Diff. moy.	Diff. crit.	Valeur p	
DG témoin, DG+but	-0,009	0,012	0,1495	
DG témoin, SG témoin	-0,032	0,015	<,0001	S
DG témoin, SG+but	-0,065	0,012	<,0001	S
DG témoin, trou	-0,159	0,017	<,0001	S
DG+but, SG témoin	-0,023	0,015	0,0016	S
DG+but, SG+but	-0,056	0,012	<,0001	S
DG+but, trou	-0,15	0,017	<,0001	S
SG témoin, SG+but	-0,033	0,015	<,0001	S
SG témoin, trou	-0,127	0,019	<,0001	S
SG+but, trou	-0,094	0,017	<,0001	S

Tableau 7 : Résultat du test de Fisher sur log (âge)

Effet : colonie

Niveau de significativité : 5 %

S = différence significative

Les abeilles émergentes butinent plus précocement dans les colonies où elles sont séparées par une double grille des butineuses (DG+but) et dans les colonies témoins où les deux lots de jeunes abeilles sont également séparées par une double grille (DG témoin). Les âges moyens qui sont respectivement 9.27 jours et 9.04 jours ne sont pas statistiquement différents au seuil de 5% (voir tableau 7).

Les comparaisons deux à deux indiquent que les âges au butinage des jeunes abeilles sont significativement différents dans toutes les autres colonies (voir tableau 7).

Les abeilles marquées séparées des butineuses par une paroi simple (SG+but) butinent au bout de 10.8 jours. Enfin dans la colonie contenant à la fois les 1000 abeilles marquées et les 1000 butineuses qui ne sont pas séparées (paroi commune trouée), l'âge moyen au butinage est le plus élevé : 13.17 jours.

IV. Discussion

Ces résultats indiquent que l'inhibition par les butineuses nécessite un contact physique avec les jeunes ouvrières pour agir pleinement sur le développement comportemental de ces dernières. Ils confirment les résultats de Huang *et al.* (1998) selon laquelle l'inhibiteur est transmis par contact physique aux ouvrières plus jeunes. Si cet inhibiteur est une phéromone, il s'agirait donc d'une phéromone de contact, non volatile.

En effet, la séparation avec une double grille, qui ne permet aucun échange physique, conduit à obtenir pour les abeilles marquées un âge moyen au butinage voisin de celui des témoins. Or les colonies témoins ne possèdent pas du tout d'inhibiteur car elles ne contiennent pas de butineuses âgées. Ainsi, il semblerait que l'absence de contact physique entre les deux cohortes d'abeilles élimine l'effet inhibiteur des butineuses sur le développement comportemental des jeunes ouvrières. Ceci semble confirmé par l'observation de l'âge au butinage des abeilles émergentes séparées des butineuses par une simple grille. Ce type de grille permet les échanges directs (trophallactiques, antennaires ou par léchage). Dans ce cas, l'âge est retardé de plus de 1 jour par rapport aux colonies témoins et aux colonies privées de tout contact physique. Cet âge se rapproche de celui de la colonie contenant ensemble les jeunes abeilles marquées et les butineuses. C'est dans ce dernier type de colonie qui autorise toutes les interactions possibles entre les ouvrières, la paroi commune étant trouée, que l'âge est le plus élevé, environ 4 jours d'écart par rapport à la colonie témoin double grille (DG témoin). Ce retard confirme bien l'effet inhibiteur des butineuses sur le développement comportemental des jeunes abeilles. Cependant, il existe une différence importante d'âge au butinage entre la colonie possédant une simple grille et la colonie rassemblant les deux cohortes sans séparation, toutes deux permettant les échanges physiques entre butineuses et jeunes ouvrières. Il semblerait que la présence de la grille empêche

l'inhibition sociale de s'exercer pleinement. Dans les travaux de Huang *et al.* (1998) les résultats concernant le développement comportemental d'abeilles séparées par une simple grille du reste de la colonie sont variables. Les auteurs expliquent cette variabilité par le fait que l'inhibition sociale dépendrait de la nature et du niveau des interactions entre abeilles encagées et le reste des membres de la société d'abeilles. Si les abeilles encagées rentrent en contact avec un plus grand nombre de jeunes abeilles que d'abeilles plus âgées, elles seront soumises à moins d'inhibiteur. Dans nos expériences nous pouvons aussi envisager le fait que les abeilles marquées séparées du groupe de butineuses, même par une grille simple, rentrent moins fréquemment en contact avec ces dernières que les jeunes ouvrières qui se déplacent librement en présence des butineuses dans la colonie sans séparation.

Nous venons de démontrer que l'inhibition est transmise par contact. Mais nous cherchons encore à connaître sa nature, est-elle chimique ? Pour répondre à cette question nous avons employé deux méthodes : la recherche d'un extrait actif de butineuses et la comparaison de profils chimiques de butineuses et de nourrices.

Partie5

**Première approche chimique :
recherche d'un extrait actif de
butineuses.**



I. Objectif et principe de l'étude

La première démarche pour caractériser les éventuelles molécules chimiques impliquées dans l'inhibition de contact consiste à rechercher un extrait de butineuses qui inhibe le développement comportemental de jeunes ouvrières. Si l'un des extraits montre une activité inhibitrice, il sera alors fractionné et les différentes fractions seront testées à leur tour sur le développement comportemental des ouvrières. La plus petite fraction active obtenue sera ensuite analysée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse afin d'identifier des molécules.

Comment choisir les extraits de butineuses à tester ?

Nous avons étudié tout d'abord l'effet d'extrait de glandes mandibulaires de butineuses car les travaux de Huang et Robinson (1998) suggèrent que ces glandes seraient à l'origine de l'inhibition sociale (voir partie1 V.3.2.).

D'autres extraits de butineuses ont été ensuite réalisés. L'inhibition sociale exercée par les butineuses nécessite des contacts entre les ouvrières. Elle pourrait donc être transmise par contact antennaire, par léchage, par trophallaxie ou par d'autres contacts cuticulaires. Nous avons supposé que les molécules pourraient se trouver sur la cuticule des butineuses ou dans certaines glandes céphaliques liées au système buccal si la transmission se fait par trophallaxie. Nous avons donc testé l'effet d'extraits cuticulaires ou céphaliques de butineuses sur le développement comportemental d'abeilles émergentes.

Pour cela, nous avons observé l'âge au butinage de jeunes abeilles placées dans des petites colonies traitées avec l'un des extraits.

II. Effet inhibiteur d'extraits de glandes mandibulaires de butineuses ?

Afin de confirmer l'hypothèse selon laquelle les glandes mandibulaires de butineuses pourraient être à l'origine de l'inhibition sociale, l'effet d'extraits de glandes mandibulaires a été testé sur l'âge au butinage de jeunes abeilles.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1. Composition des colonies

L'expérience qui s'est déroulée en juillet 1999 est réalisée avec des colonies à triple cohorte. Comme dans les expériences comportementales, les colonies sont placées dans des *nuclei* conformément au protocole mentionné dans la partie 2 II.2. Chacune contient :

- 500 abeilles émergentes
- 500 butineuses
- 500 nourrices

Les abeilles émergentes sont obtenues à partir de cadres de couvain placés le jour précédent dans une étuve chauffée à 34°C (voir partie 2 II.2.)

Les butineuses et les nourrices sont collectées directement dans la colonie mère dans le *nucleus* à l'aide d'un aspirateur portatif. L'entrée de la ruche est bloquée pour permettre le prélèvement des butineuses (voir partie 2 II.2). Les nourrices sont prélevées à

l'intérieur du nid alors qu'elles s'occupent des larves. Elles se distinguent du reste des ouvrières par le fait que leur tête est plongée dans des cellules de couvain non operculées. L'observation porte toujours sur la cohorte d'abeilles émergentes, marquées d'un point de peinture sur leur thorax dont la couleur est spécifique à la colonie expérimentale.

Les *nuclei* sont placés à 10 Km de leur ruche d'origine pour empêcher que les butineuses et les nourrices ne retournent dans leur colonie mère.

Une quatrième cohorte d'abeilles émergentes est rajoutée dans chaque *nucleus* au bout de 7 jours pour maintenir les conditions normales de la colonie dans laquelle de nouvelles abeilles naissent régulièrement (Le Conte *et al.*, 2001).

II.1.2. Traitements

Au cours de l'expérience, quatre colonies à triple cohorte sont comparées :

-deux colonies sont traitées quotidiennement avec 400 équivalents d'extraits de glandes mandibulaires de butineuses mélangés à 1 gramme de candi (1 partie de miel/1,5 partie de sucre glace)

-deux colonies témoins reçoivent journallement la même dose de solvant d'extraction seul, le méthanol, mélangé à 1 gramme de candi

Ces extraits ont été préparés par Slessor, K, au laboratoire de Biochimie de l'Université Simon Fraser, British Columbia, au Canada. Ils sont composés des trois molécules identifiées dans les glandes mandibulaires des ouvrières :

- l'acide 10-hydroxy-(E)-2-décénoïque (10-HDA)
- l'acide 10-hydroxydécanoate (10-HDAA)
- l'acide 8-hydroxy-octanoïque

Cette voie d'administration de molécules chimiques dans du candi nous a semblé bien adaptée. En effet, l'inhibiteur des butineuses agirait par contact sur les plus jeunes (Huang *et al.* (1998), partie 4). Le candi permet toutes les formes de contacts car les abeilles vont pouvoir le toucher avec leurs antennes, le lécher et l'ingérer. De plus, d'autres études ont montré que les phéromones modificatrices de couvain et de reine étaient actives sur les abeilles lorsqu'elles étaient administrées sous cette forme (Le Conte *et al.*, 2001).

II.1.3. Mesure du développement comportemental

L'âge au butinage des abeilles émergentes permet de mesurer le rythme de développement comportemental des ouvrières. Pour cela, deux fois par jour (matin et après-midi), l'entrée de chaque *nucleus* est fermée pendant 30 minutes et les nouvelles butineuses sont dénombrées et marquées d'un nouveau point de peinture sur l'abdomen afin de ne pas être comptées deux fois.

Les résultats vont être traités avec le test non paramétrique de Mann-Whitney qui permet la comparaison de deux groupes non appariés. Ce test est réalisé avec le logiciel StatView.

II.2. Résultats

La figure 18 ainsi que le tableau 8 présentent les résultats.

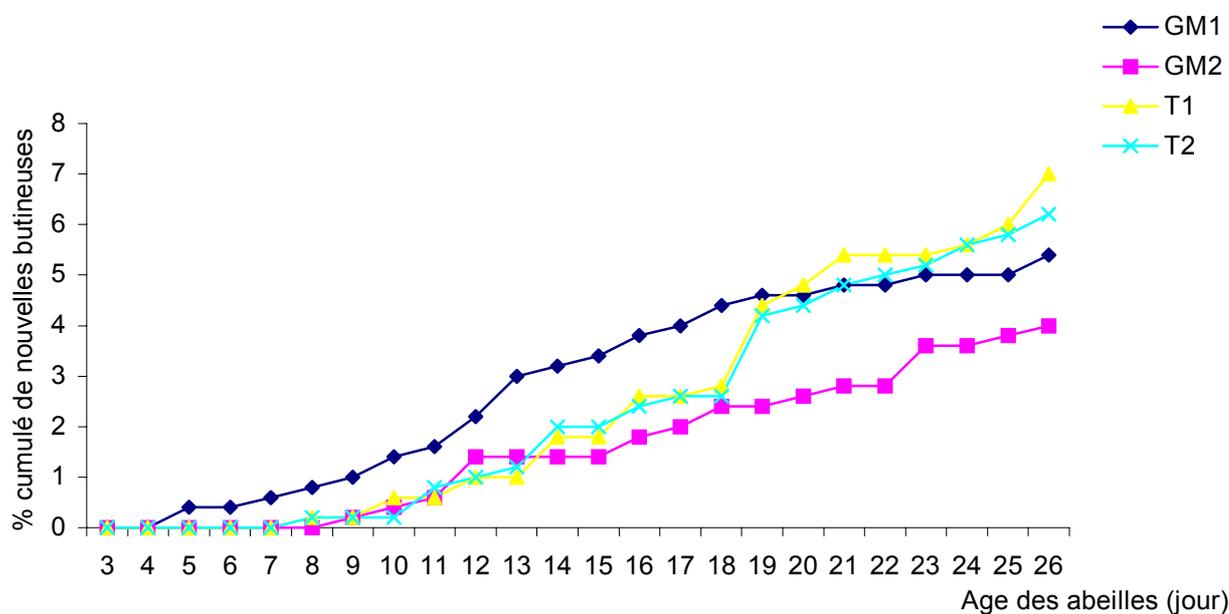


Figure 18 : Effet des glandes mandibulaires de butineuses sur l'âge au butinage des jeunes abeilles.

GM1 = colonie 1 traitée avec des extraits de glandes mandibulaires de butineuses

GM2 = colonie 2 traitée avec des extraits de glandes mandibulaires de butineuses

T1 et T2 = colonies témoins 1 et 2 ne recevant que du méthanol

Comparaison 2 à 2	P de Mann-Whitney
GM1 / T1	0.0018
GM1 / T2	0.0068
GM2 / T1	0.399
GM2 / T2	0.6701
GM1 / GM2	0.0881
T1 / T2	0.6073

Tableau 8 : Comparaison de l'âge moyen au butinage entre les colonies traitées aux extraits de glandes mandibulaires et les témoins (test de Mann-Whitney à 5 %).

Une colonie (GM1) sur les deux traitées avec les glandes mandibulaires de butineuses, présente une différence significative par rapport aux deux colonies témoins. La seconde colonie traitée (GM2) n'est pourtant pas statistiquement éloignée de GM1 ni des deux témoins (T1 et T2).

De plus, si on regarde sur le graphe les pourcentages cumulés de nouvelles butineuses pendant les 15 premiers jours, période qui correspond à un butinage précoce, les chiffres sont très proches entre les quatre colonies : 3.4% d'abeilles butineuses dans GM1 et 1.4% dans la colonie GM2 alors que chez les témoins il y en a : 1.8 dans T1 et 2% dans T2. A la fin des 26 jours d'expérimentation, les pourcentages cumulés de butineuses sont plus importants dans les colonies témoins (T1 = 7%, T2 = 6.2%) que dans les colonies traitées (GM1 = 5.4% et GM2 = 4%).

II.3. Discussion

Cette expérience ne valide pas l'hypothèse d'après laquelle l'inhibiteur se trouverait dans les glandes mandibulaires des ouvrières âgées.

Cette hypothèse a commencé à être vérifiée en utilisant non pas des extraits de glandes mais des abeilles âgées chez qui les glandes mandibulaires ont été enlevées. Les jeunes abeilles placées dans des colonies au contact de ces ouvrières âgées opérées ne sont plus inhibées et partent butiner précocement par rapport aux témoins (Huang *et al.*, 1998). Pourtant ces résultats ne sont pas confirmés par notre expérience qui teste cette fois-ci l'effet du contenu des glandes mandibulaires sur le développement de jeunes abeilles. La conclusion des travaux de Huang *et al.* n'est cependant pas que les glandes mandibulaires sont la source de l'inhibition mais plutôt que l'ablation de ces glandes provoque une perte de l'inhibition. Autrement dit, l'opération pourrait affecter un éventuel comportement d'inhibition ou la transmission de substances chimiques produites dans une autre région de l'organisme.

Notre étude ne montre aucun effet inhibiteur du contenu des glandes, toutefois nous ne pouvons pas conclure que les glandes mandibulaires ne sont pas impliquées dans l'inhibition sociale. Nous constatons seulement que les extraits de glandes ne sont pas actifs dans nos conditions d'analyses.

Sur la base de ces résultats, nous avons élargi notre étude en testant l'effet d'autres extraits de butineuses sur le développement comportemental de jeunes ouvrières.

III. Effet inhibiteur d'extraits cuticulaires ou céphaliques de butineuses ?

Nous avons testé l'effet d'extraits cuticulaires et céphaliques de butineuses sur l'âge au butinage d'ouvrières émergentes.

III. 1. Matériel et méthodes

III.1.1. Extraction des composés cuticulaires et céphaliques de butineuses

Prélèvement des butineuses

Les butineuses sont obtenues en apposant à l'entrée de la ruche une grille qui empêche les abeilles de pénétrer à l'intérieur. Celles qui reviennent avec une charge de pollen ou l'abdomen distendu par le nectar sont aspirées dans une boîte.

Ces boîtes sont ensuite placées à -80°C.

Préparation des extraits

Les abeilles sont plongées dans du pentane pendant 10 minutes. Le pentane est un solvant apolaire qui permet d'extraire des composés lipidiques dont les hydrocarbures cuticulaires. La solution obtenue est ensuite filtrée puis elle est concentrée par

évaporation à l'azote gazeux. Cette concentration permet de concentrer les composés cuticulaires dans un minimum de solvant.

Afin d'obtenir la gamme la plus large de composés chimiques de butineuses, il convient de prélever les produits polaires tels que des hormones, des phéromones, des métabolites ou des protéines, qui pourraient être contenus dans les têtes des abeilles. Après l'extraction pentanique, les abeilles sont donc récupérées et décapitées. A l'aide d'un mortier, les têtes sont broyées dans du méthanol, solvant polaire, pendant 10 minutes. Le broyat est ensuite filtré à l'aide de papier filtre et la solution obtenue est concentrée par centrifugation (Speed Vac® SC110, Savant).

III.1.2. traitements des colonies

Les extraits cuticulaires de butineuses et les extraits céphaliques de butineuses ont été testés sur des abeilles émergentes placées en colonies à simple cohorte, chaque colonie recevant quotidiennement un seul type de traitement (voir figure 19).

L'étude de l'effet des extraits cuticulaires sur l'âge au butinage des abeilles est réalisée sur un lot de deux colonies à simple cohorte, traitées différemment :

1-une colonie traitée avec les extraits cuticulaires, à la dose de 400 équivalents-butineuses par jour, mélangés à 0,5g de candi

2-une colonie témoin traitée avec seulement le solvant (pentane) mélangé à 0,5g de candi.

L'étude sur l'effet des extraits céphaliques de butineuses sur l'âge au butinage des jeunes abeilles se fait suivant le même protocole sur un lot de deux colonies à simple cohorte :

1-une colonie traitée quotidiennement avec les extraits de têtes à une dose de 400 équivalents-butineuses dans 0,5 g de candi

2-une colonie témoin traitée tous les jours avec le solvant (méthanol) mélangé à 0,5g de candi.

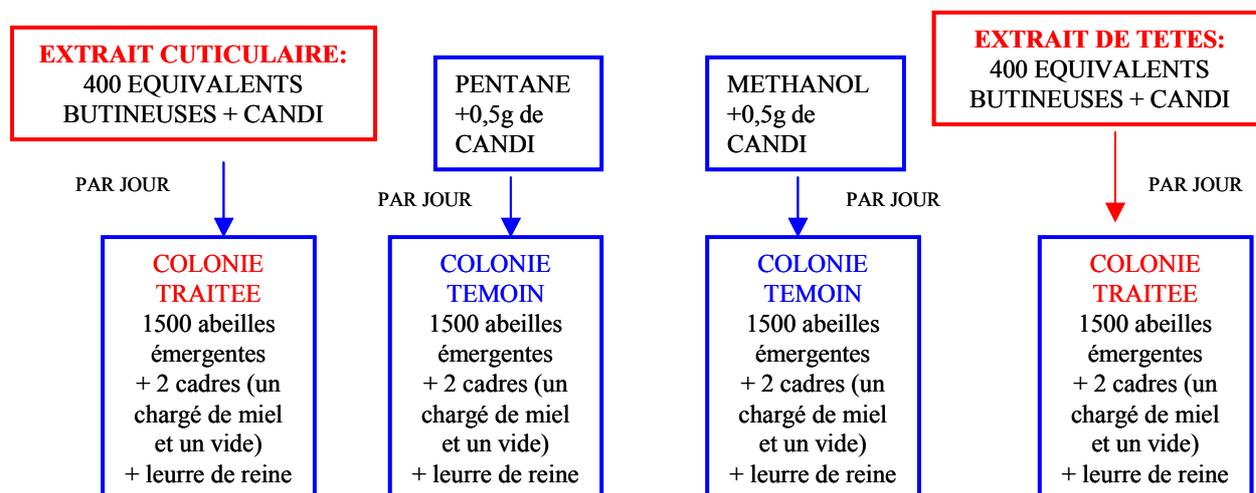


Figure 19 : Compositions des colonies et traitements administrés

Des études préliminaires qui ne sont pas présentées ici ont permis de vérifier si les solvants seuls agissent sur le développement comportemental des abeilles. Des colonies d'abeilles traitées avec du pentane ou du méthanol sont comparées à des colonies ne recevant que du candi. Les résultats ont montré que les solvants n'affectent pas le développement des ouvrières. Par conséquent, les colonies traitées au pentane et celles traitées au méthanol peuvent être considérées comme les colonies témoins.

L'âge moyen au butinage des 50 premières butineuses est pris comme critère de développement comportemental

Les expériences ont été effectuées sur deux années, 1999 et 2000, au cours du printemps et de l'été. Pour les expériences sur les extraits cuticulaires, 10 séries ont été effectuées de mai à fin juillet 1999 et 4 séries de mai à juillet 2000. En ce qui concerne les extraits céphaliques, 4 séries ont été réalisées au mois de juillet 1999, et trois séries de mai à juin 2000.

III.1.3. Analyses statistiques

Des tests non paramétriques sont utilisés car ils ne font pas l'hypothèse d'une distribution des observations suivant la loi normale et ils n'impliquent pas d'égalité des variances entre les sous-échantillons. Pour la comparaison d'échantillons simples, (un seul facteur) nous avons retenu le test de Mann-Whitney effectué avec le logiciel StatView. Dans le cas de la comparaison de plusieurs colonies nous avons utilisé le test de Friedman qui permet d'éliminer le facteur dû aux séries et d'analyser uniquement le facteur traitement (Sprent, 1992).

Ce test est réalisé en utilisant un programme élaboré par le Professeur M. Roux.

De plus, une analyse de variance à deux facteurs permet de tester l'effet du traitement et l'effet de la température. Elle est réalisée sur les données qui ont subi au préalable une transformation logarithmique afin d'homogénéiser les variances des échantillons.(Sokal et Rohlf, 1995 ; Fisher et van Belle, 1993).

III.2. Résultats

III.2.1. Effets des extraits cuticulaires de butineuses

La figure 20 montre les résultats moyens des séries de 1999 et de 2000

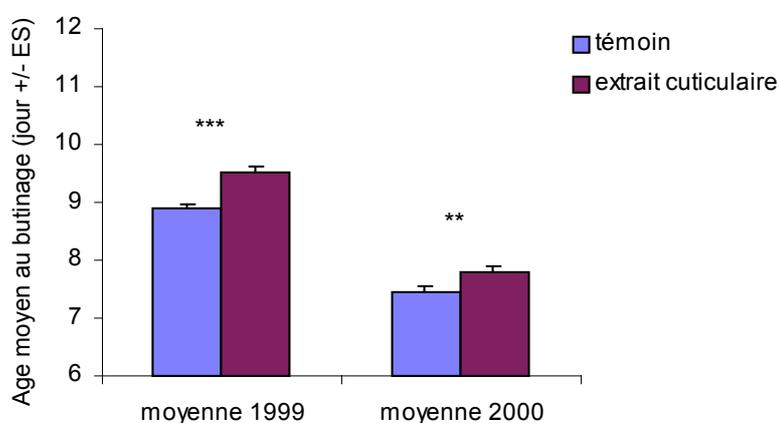


Figure 20 : Effet global par année des extraits cuticulaires de butineuses sur l'âge au butinage des jeunes ouvrières.

Les étoiles indiquent une différence significative entre les groupes à 1%=(**) ou à 0.1%=(***) (test de Friedman).

L'âge moyen au butinage des abeilles traitées avec les extraits cuticulaires de butineuses est significativement plus élevé que celui des abeilles témoins (voir figure 20).

Les abeilles partent butiner pour la première fois à 8.9 jours (expériences de 1999) et 7.4 jours (expériences de 2000) dans les colonies témoins alors qu'elles débutent leur butinage vers 9.5 jours et 7.8 jours dans les colonies recevant les extraits cuticulaires de butineuses. En 1999 et en 2000, ces différences sont significatives au seuil de 1% (voir tableau 9).

Pourtant, si on regarde en 1999 puis en 2000, chaque série indépendamment, l'effet du traitement ne ressort pas toujours (voir figure 21 et 22).

	Valeur observée	Valeur critique dans la table du Khi-2 à 1 ddl	Résultat du test H0=pas d'effet du traitement sur l'âge au butinage
10 séries de 1999	19.4	seuil de 0.1% : 10.83	H0 rejetée, Effet significatif à 0.1%
4 séries de 2000	9.677	seuil de 1% : 6.63	H0 rejetée, Effet significatif à 1%
5 séries de 1999, T<30°C	60.22	seuil de 0.1% : 10.83	H0 rejetée, Effet significatif à 0.1%
3 séries de 2000, T<30°C	19.07	seuil de 0.1% : 10.83	H0 rejetée, Effet significatif à 0.1%

Tableau 9 : Résultats du test de Friedman sur l'effet des extraits cuticulaires sur l'âge au butinage des abeilles.

Résultats par année.

Expériences de 1999 (voir figure 21) :

5 séries sur 10 montrent un retard significatif de l'âge moyen au butinage chez les abeilles traitées par rapport aux témoins (test de Mann-Whitney au seuil de 5% : séries 1, 2 et 4, $P < 0.0001$; série 3, $P = 0.0255$ et série 7, $P = 0.0126$). Ce retard est compris entre 1 ou 2 jours.

Trois séries présentent un effet inverse du traitement, c'est-à-dire que l'âge moyen au butinage est plus bas dans les colonies traitées (séries 6, 9 et 10). Une de ces séries (série 6) indique un effet inverse significatif, (test de Mann-Whitney, $P < 0.0001$).

Sur le graphique sont mentionnées les températures extérieures moyennes au cours de chacune des expériences (moyenne des températures journalières). Il existe un effet de la température significatif sur l'âge au butinage ($F = 28.4$, $P < 0.0001$).

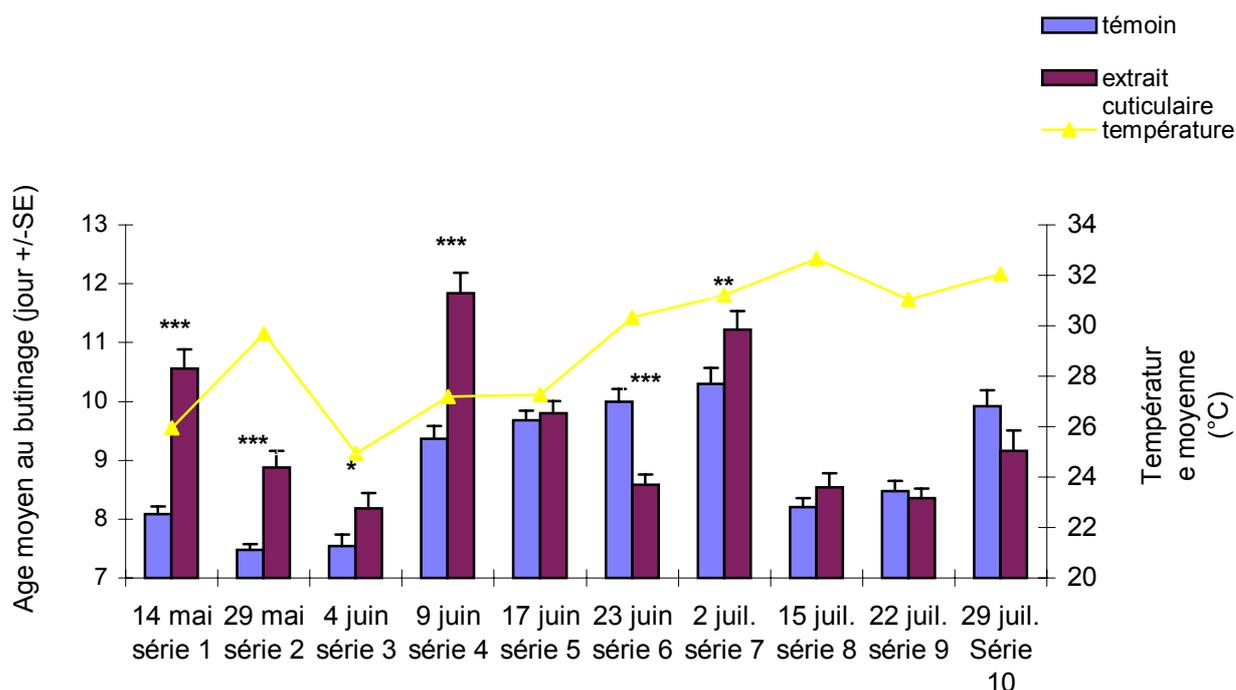


Figure 21 : Résultats 1999

Effet des extraits cuticulaires de butineuses sur l'âge au butinage de jeunes ouvrières par série.

Les étoiles indiquent une différence significative entre les groupes: *** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$ et * = $P < 0.05$ (test de Mann-Whitney)

Expériences de 2000 (voir figure 22) :

Les trois premières séries (sur un total de 4) montrent un retard d'environ 1 jour de l'âge moyen du début du butinage des colonies traitées par rapport aux témoins. Ce retard est significatif au seuil de 5% (test de Mann-Whitney : série 1, $P=0.0108$; série 2, $P=0.0051$ et série 3, $P=0.0069$). La quatrième série montre l'effet inverse mais non significatif du traitement. De plus, il existe un effet significatif de la température sur l'âge au butinage des jeunes ouvrières ($F=17.15$, $P<0.0001$).

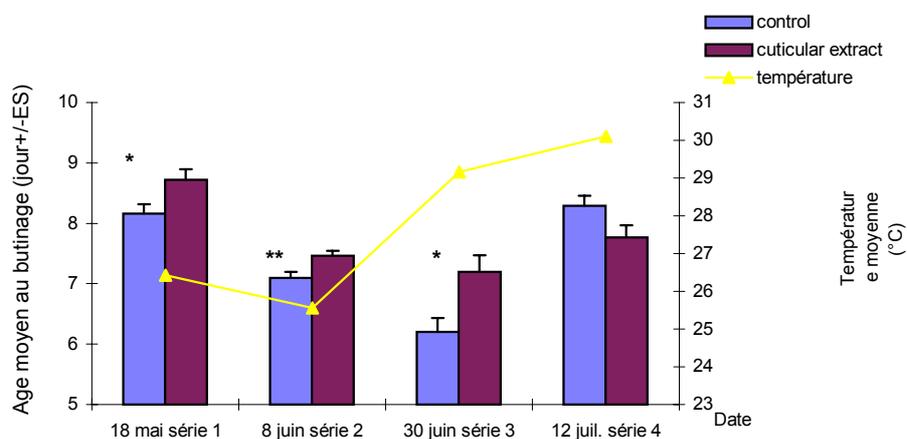


Figure 22 : Résultats 2000 par série

Effet des extraits cuticulaires de butineuses sur l'âge au butinage de jeunes ouvrières.

Les étoiles indiquent une différence significative entre les groupes : ** = $P<0.01$ et * = $P<0.05$ (test de Mann-Whitney)

On considère à présent les séries réalisées à une température extérieure moyenne inférieure à 30°C : les 5 premières séries de 1999 et les 3 premières de 2000 (voir figure 23). Dans toutes ces 8 séries, les abeilles en présence d'extraits cuticulaires butinent plus tard que les témoins.

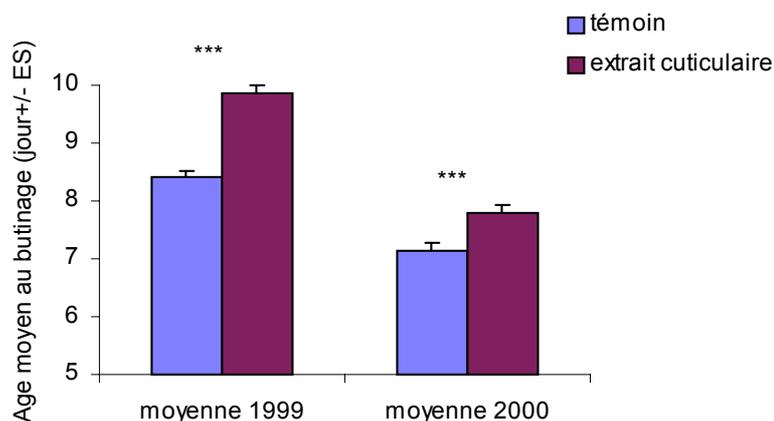


Figure 23 : Effet global des extraits cuticulaires des 5 premières séries en 1999 et des 3 premières séries en 2000.

Les étoiles (***) indiquent une différence significative entre les groupes à 0.1% (test de Friedman).

Par rapport aux résultats de l'ensemble des séries, l'effet du traitement est très net. L'écart de l'âge moyen du butinage des abeilles augmente entre colonie traitée et colonie témoin. En 1999, les abeilles témoins butinent pour la première fois à 8.4 jours alors que les abeilles traitées commencent cette activité à partir de 9.8 jours soit plus d'un jour après. Les résultats du test de Friedman sont encore plus significatifs au seuil de 0.1% (voir tableau 9), ce qui indique bien un effet significatif du traitement. Dans les expériences de 2000, le retard de l'âge au butinage va dans le même sens, les butineuses témoins ont environ 7.1 jours alors que les traitées atteignent 7.8 jours. Là encore la différence est significative à 0.1% (voir tableau 9).

	Valeur observée	Valeur critique dans la table du Khi-2 à 1 ddl	Résultat du test H0=pas d'effet du traitement sur l'âge au butinage
4 séries de 1999	0.01	seuil de 1% : 6.63	H0 acceptée, Effet non significatif à 1%
3 séries de 2000	11.66	seuil de 0.1% : 10.83	H0 rejetée, Effet significatif à 0.1%

Tableau 10 : Résultats du test de Friedman sur l'effet des extraits céphaliques sur l'âge au butinage des abeilles.

Résultats par année.

III.2.2. Effets des extraits céphaliques de butineuses

Les résultats de l'âge moyen au butinage des expériences de 1999 ne révèlent aucun effet significatif du traitement (voir figure 24 et tableau 10). Toutefois, l'âge moyen est légèrement plus élevé chez les abeilles recevant les extraits céphaliques de butineuses, 9.1 jours contre 8.9 chez les abeilles témoins

En 2000, l'effet du traitement est inversé, les abeilles traitées ont un âge moyen au butinage de 7.8 jours alors que les témoins partent butiner plus tard à 8.4 jours. Cette différence est significative à 0.1% (voir tableau 10).

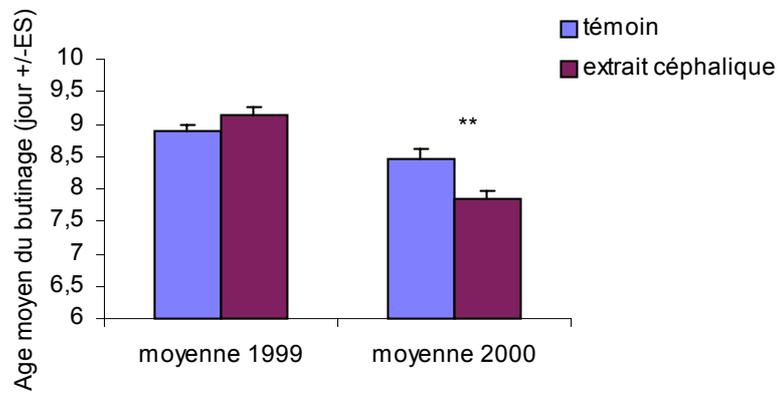


Figure 24 : Effet global par année des extraits céphaliques de butineuses sur l'âge au butinage des jeunes ouvrières.

Les étoiles (**) indique une différence significative entre les groupes (test de test de Friedman à 1%)

Le graphe suivant, (figure 25) indique les résultats de 1999 et de 2000 par série.

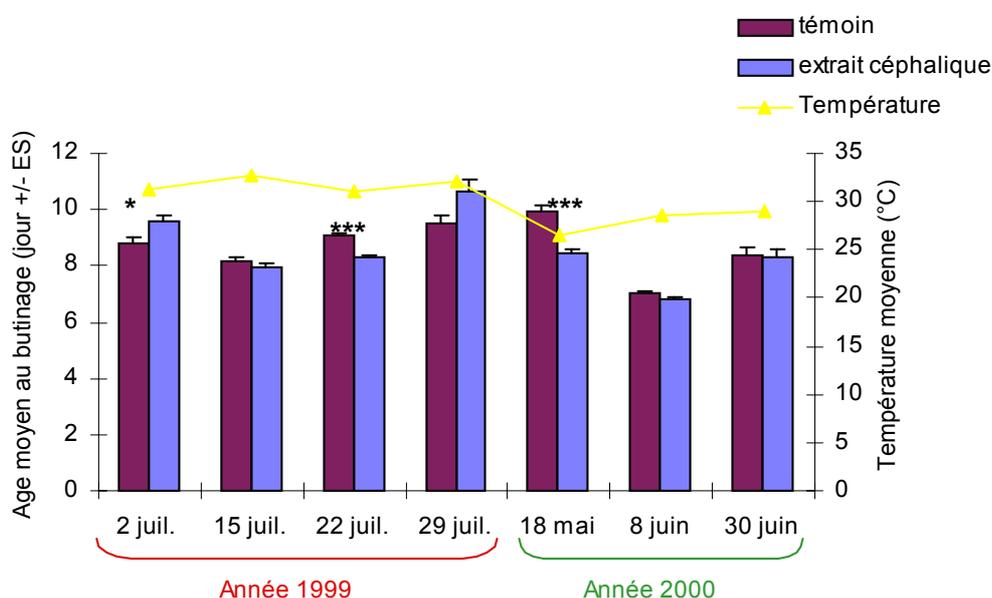


Figure 25 : Résultats 1999 et 2000 par série

Effet des extraits céphaliques de butineuses sur l'âge au butinage de jeunes ouvrières.

*** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$ et * = $P < 0.05$ (test de Mann-Whitney)

Une seule série sur 7 montre un retard significatif d'un jour de l'âge moyen au butinage entre les abeilles traitées avec des extraits de têtes et les témoins (série du 2 juillet 1999, test de Mann-Whitney : $P = 0.0038$).

Bien que dans la série du 29 juillet 1999 on observe une augmentation de l'âge moyen au butinage chez les abeilles recevant le traitement, cette différence entre colonie traitée et colonie témoin n'est pas significative (test de Mann-Whitney : $P = 0.0640$).

Dans deux séries sur 7 l'effet traitement s'inverse de façon significative, les abeilles partent butiner environ 1 jour plus tôt lorsqu'elles sont en présence d'extraits céphaliques de butineuses (série du 22 juillet 1999, $P < 0.0001$; série du 18 mai 2000, $P < 0.0001$).

III.3. Discussion

Les expériences de 1999 et 2000 montrent que les extraits cuticulaires de butineuses augmentent l'âge au butinage des abeilles. Des molécules présentes sur la cuticule pourraient donc être impliquées dans l'effet inhibiteur des butineuses âgées sur le développement comportemental des ouvrières plus jeunes de la colonie. En revanche, les expériences qui ont été réalisées ne montrent aucun effet inhibiteur des extraits céphaliques de butineuses sur l'âge au butinage des abeilles.

Ces résultats renforcent l'hypothèse de Huang et Robinson (1998) sur l'existence d'une phéromone de contact, à l'origine de l'inhibition sociale, qui serait transmise lors des interactions entre ouvrières par contacts antennaire, par léchage ou par frottement au niveau de la cuticule. Le signal qui permet l'inhibition sociale serait donc bien chimique.

L'ensemble des résultats de 1999 et ceux de 2000 indiquent bien un effet des extraits cuticulaires de butineuses sur l'augmentation de l'âge au butinage des abeilles par rapport aux témoins. Cependant comment expliquer la variabilité des résultats sur l'effet des extraits cuticulaires lorsqu'on considère chacune des séries ? Des paramètres extérieurs comme les conditions climatiques par exemple pourraient venir perturber l'état général de la colonie et par là masquer ou modifier l'effet du traitement. En effet, les conditions climatiques peuvent influencer sur le comportement des colonies. Riessberger et Crailsheim (1997) ont montré l'effet à court terme des conditions météorologiques sur le comportement des butineuses et des nourrices. Ainsi, les jours de pluie, les butineuses présentent de longues phases d'inactivité et les nourrices passent moins de temps à s'occuper du couvain

Dans la région d'Avignon, la température estivale est particulièrement élevée, l'hygrométrie très basse, et les espèces végétales susceptibles d'être butinées sont beaucoup moins nombreuses. La chaleur associée à une baisse des ressources modifierait le fonctionnement de la colonie par la nécessité de maintenir la température du couvain à 34°C obligeant les abeilles à rafraîchir le nid. Pour cela, les ouvrières commencent à

ventiler en agitant les ailes, évaporent de l'eau et même évacuent la ruche dans les conditions les plus extrêmes. Chadwick (1931) a montré l'efficacité de la ventilation pour diminuer la température du nid.

Quand le besoin en eau se fait ressentir pour humidifier la colonie, les butineuses rentrant à la ruche avec de l'eau ou du nectar dilué sont plus facilement acceptées par les abeilles déchargeuses que les ouvrières rapportant du pollen concentré. Ce phénomène stimule la collecte d'eau (Lindauer, 1954).

De plus, par rapport à la pleine saison d'activité d'avril à juin, en été les abeilles sont moins actives (Le Conte, communication personnelle). Pour chaque série de 1999 et 2000, la température extérieure moyenne au cours de la période d'observation du butinage des abeilles a été calculée. En superposant cette courbe des températures extérieures avec les âges moyens du début du butinage, nous avons pu constater qu'au delà d'une moyenne de 30°C, les résultats sont beaucoup plus variables entre les séries et l'effet inhibiteur des extraits cuticulaires apparaît moins nettement sur le développement comportemental des jeunes ouvrières. On retrouve ce phénomène en 1999 et en 2000. Pour chaque année, nous avons donc considéré l'effet global des extraits cuticulaires dans les séries réalisées à une température moyenne inférieure à 30°C. L'effet inhibiteur du traitement est encore plus marqué.

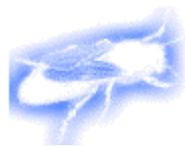
La température pourrait donc effectivement masquer l'effet des extraits cuticulaires.

Un autre paramètre extérieur est la nourriture. On a observé que si la source de nourriture découverte par une colonie était très abondante, les abeilles pouvaient l'utiliser pendant plusieurs jours. L'intensité du recrutement au butinage dans une telle colonie sera plus élevée que dans une colonie qui ayant trouvé une source moins importante de nourriture. Ainsi l'observateur pourrait enregistrer des différences de butinage dues à des différences portant sur les quantités de nourriture trouvée et non sur l'activité de la colonie. Mais les expériences ont été répétées plusieurs fois en changeant les colonies de place afin de minimiser l'effet de paramètres environnementaux que l'expérimentateur ne peut contrôler.

A côté des conditions extérieures, nous avons supposé que l'origine des abeilles pourrait être un autre facteur expliquant les différences entre les résultats obtenus en 1999. En effet, les six premières séries ont été réalisées avec des colonies *Apis mellifera ligustica* déjà présentes sur le Centre INRA d'Avignon l'année précédente. A partir du mois de juillet (série7), nous avons utilisé les abeilles provenant de la région de Bourges car il nous manquait des colonies pour nos expérimentations. Ces nouvelles colonies sont un croisement entre les races *ligustica* et *caucasica*. Cette abeille hybride est utilisée par les éleveurs de reines et par les producteurs de gelée royale car elle est connue pour sa grande capacité à élever le couvain. On a pensé que ces nouvelles abeilles, moins actives pour le butinage, pourraient être moins sensibles à l'inhibiteur et produiraient également moins de composés inhibiteurs. De plus, les travaux de Brillet *et al.* (2001) montrent que l'inhibition sociale ne s'exprime bien chez *ligustica* mais pas chez *caucasica*. Mais l'expérience réalisée au début du mois de juillet avec cette nouvelle source d'abeilles (série 7) montre un effet inhibiteur des extraits cuticulaires de butineuses sur le butinage des jeunes ouvrières. Donc ce facteur a été écarté.

Partie 6

**Seconde approche chimique :
étude comparative des profils chimiques
de butineuses et de nourrices.**



I. Objectif et principe de l'étude

Afin de caractériser l'inhibition sociale, une autre approche expérimentale a été utilisée. Nous avons comparé les profils chimiques de nourrices et de butineuses afin de mettre en évidence d'éventuelles molécules spécifiques de ces dernières par leur nature ou par leur quantité.

Une analyse de comparaisons des profils chimiques des ouvrières est en cours au laboratoire de Biochimie de l'Université Simon Fraser, British Columbia, au Canada, dirigé par Slessor, K. Des résultats préliminaires ont montré la présence de certains composés de la phéromone de couvain chez les ouvrières. Or ces esters méthyliques et éthyliques d'acides gras de 16 à 18 atomes de carbones sécrétés par les larves inhibent le développement comportemental des ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001). Comme nous recherchons ce même effet mais provoqué cette fois-ci par les butineuses, nous allons étudier la spécificité éventuelle de ces molécules chez les butineuses par rapport aux autres abeilles de la colonie.

Dans cette partie, trois études, réalisées successivement, vont être décrites. La première vise à identifier puis à quantifier les différents esters chez les nourrices et chez les butineuses. Ces abeilles sont collectées dans leur colonie d'origine en fonction de leur tâche.

Après avoir identifié une molécule candidate, nous avons tenté de la localiser plus précisément dans le corps de la butineuse pour connaître son mode de transmission.

Ces résultats nous ont conduit à entreprendre une seconde étude sur la quantification de la molécule candidate (et d'autres esters trouvés en quantité moindre) en fonction de l'âge des ouvrières. L'objectif est de confirmer les résultats obtenus chez les butineuses et les nourrices qui étaient d'âge inconnu dans la première expérience.

Enfin, la troisième étude comportementale vient compléter ces résultats en testant l'effet inhibiteur de la molécule candidate sur le développement comportemental de jeunes abeilles.

II. Comparaison des quantités d'esters d'acides gras entre nourrices et butineuses

Cette première étude vise à établir les profils d'esters d'acides gras chez des nourrices et des butineuses, esters dont le mélange inhibe le développement comportemental des ouvrières.

II.1. Matériel et méthodes

II. 1. 1. Matériel biologique

Dans cette expérience préliminaire une ruche d'*Apis mellifera ligustica* a été utilisée.

Les abeilles nourrices sont prélevées à l'intérieur de la colonie lorsqu'elles sont en train de s'occuper des larves c'est-à-dire qu'elles ont la tête dans des cellules de couvain. Les butineuses sont capturées en apposant une grille à l'entrée de la ruche qui empêche les abeilles revenant de leur butinage de rentrer. Celles qui reviennent avec une charge de pollen ou de nectar sont collectées.

Les nourrices et les butineuses sont ensuite placées à -80°C .

II.1.2. Préparation des extraits

Chaque échantillon correspond aux broyats totaux de 10 nourrices ou de 10 butineuses. Les 10 abeilles sont placées dans un tube contenant 2ml d'iso-hexane et 100 μ l d'une solution de trois standards internes à 5ng/ μ l. Ces trois standards sont :

- le cis-10-pentadécanoate de méthyle
- l'heptadécanoate de méthyle
- le nonadécanoate de méthyle

Le cis-10-pentadécanoate de méthyle est utilisé pour quantifier les molécules recherchées dans les extraits par la méthode de l'étalonnage interne. Les deux autres servent au calcul des grandeurs de rétention pour l'identification de chaque ester.

Le broyage total est réalisé à l'aide d'une fine tige de verre pendant 10 min. Les broyats sont ensuite centrifugés pendant 20 min à 4°C à 4000 tours/min. Le surnageant est récupéré. 500 μ l d'iso-hexane sont ajoutés dans le culot qui est ensuite centrifugé à nouveau pendant 20 min à 4°C à 4000 tours/min. Puis, ce second surnageant est rajouté au premier. La combinaison des deux surnageants forme l'extrait brut de 10 abeilles.

Après broyage, un fractionnement de l'extrait brut permet de le purifier.

II.1.4. Fractionnement

Avant le fractionnement, l'extrait brut est concentré sous un flux d'azote jusqu'à obtenir un volume final d'environ 100 μ l.

Le fractionnement de ce chaque extrait est réalisé sur une colonne ouverte de 0.71g de Silice (Silice 60, taille des particules, 0.0040-0.0063 mm). La silice est préalablement chauffée à 500°C pendant 8 heures.

La colonne est une pipette Pasteur de 9 cm de long et de 0.5 cm de diamètre. De la fibre de verre est utilisée pour boucher la pipette avant le remplissage de la colonne avec la silice.

Deux solvants d'élution sont utilisés successivement. Le premier solvant (S1) correspond à 98.5% d'iso-hexane et 1.5% d'éther éthylique. Le second (S2) contient 94% d'iso-hexane et 6% d'éther éthylique.

Avant le dépôt de l'extrait, la colonne est conditionnée avec 5ml de S1. L'extrait est déposé en tête de colonne et le passage de 4ml de S1 permet d'obtenir la fraction 1 ne contenant par les esters. La colonne est ensuite éluée avec 2ml de S2, ce qui permet d'obtenir la fraction 2. Celle-ci contient les esters méthyliques et éthyliques d'acides gras recherchés. La phase de mise au point a mis en évidence qu'une troisième fraction, obtenue après le passage supplémentaire de 2ml de S2 dans la colonne, ne contient plus d'esters d'acides gras.

II.1.5. Identification

A. Identification en chromatographie en phase gazeuse

La fraction 2 est analysée en chromatographie en phase gazeuse (CPG). On prélève 500 μ l de cette fraction (1/4 du volume) qui sont évaporés en totalité sous un courant d'azote. Puis on ajoute un volume de 100 μ l d'iso-hexane. 1 μ l de cette solution est injectée en CPG.

Caractéristiques de la chromatographie en phase gazeuse

Le chromatographe utilisé est un Varian 3800 équipé d'un injecteur split/splitless, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID, Flame Ionization Detector), d'une colonne

capillaire polaire HP-INNO-WAX® (longueur : 25m ; diamètre intérieur : 0.20mm ; épaisseur de film : 0.2 μ m) et d'un logiciel d'acquisition et de retraitement des données BORWIN®.

Les conditions de l'analyse sont les suivantes :

Gaz vecteur : Hélium

Pression en tête de colonne : 108 KPa

Température de l'injecteur : 230°C

Mode d'injecteur : splitless

Température du détecteur : 320°C

Le programme de température du four-colonne est le suivant : température initiale 60°C, montée jusqu'à 180°C avec un pas de 30°C/min. Puis montée jusqu'à 210°C avec un pas de 1.5°C. Enfin, montée jusqu'à 230 avec un pas de 20°C/min, maintien : 10 min.

Grandeur de rétention :

L'identification des esters d'acides gras s'est effectuée sur la base de leur longueur équivalente de chaîne (LEC) spécifique d'un acide sur une phase dans des conditions données. Habituellement, les LEC sont pris en compte pour des mélanges d'esters méthyliques d'acides gras, ici par commodité, on utilise le même calcul même s'il s'agit d'esters éthyliques.

Dans la littérature (Tranchant, 1983) on trouve la formule des LEC qui, en programmation de température, se réduit de la façon suivante :

$$LEC_x = \frac{2 (tr_x - tr_n)}{(tr_{n+2} - tr_n)} + n$$

LEC_x = longueur équivalente de chaîne du composé inconnu X

tr_x = temps de rétention du composé inconnu X

tr_n = temps de rétention de l'ester méthylique saturé linéaire de longueur de chaîne n, élué avant X

tr_{n+2} = temps de rétention de l'ester méthylique saturé linéaire de longueur de chaîne n+2, élué après X

n = ester méthylique saturé linéaire de longueur de chaîne n, (ici n = 17)

n+2 = ester méthylique saturé linéaire de longueur de chaîne n+1, (ici n+2 = 19)

Afin d'identifier les molécules présentes dans les extraits, leurs LEC sont comparées à celles des esters d'acides gras de référence.

B. Identification en spectrométrie de masse

La vérification de l'identité des composés est réalisée par une analyse en CPG couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM). Toutes les expériences en spectrométrie de masse ont été effectuées en collaboration avec Guy Costagliola à l'UMR-INRA-GRAPPA, Site Agroparc, Avignon.

Le système utilisé est composé d'un chromatographe Trace 2000 (ThermoFinnigan) équipé d'un injecteur PTV, d'un passeur automatique d'échantillon AS 2000, d'un

spectromètre de masse Polaris, de type « ion trap » à source externe et d'un ensemble logiciel d'acquisition et de traitement des données chromatographiques et spectrométriques. Les spectres ont été effectués en impact électronique à 70eV. La colonne utilisée est de type RTX 200-MS (Restek) en programmation de température.

Cependant, le spectre de masse des esters méthyliques ou éthyliques d'acide gras mono-insaturés ne suffit pas à caractériser la molécule. En effet, le spectre présenté ci-dessous (figure 25) indique seulement qu'il s'agit d'un ester éthylique d'acide gras, mono-insaturé. Dans la nature, les isomères cis sont les plus les abondants mais ils ne se séparent pas en CPG, il faut donc déterminer la position de la double liaison afin de pouvoir dire si le spectre correspond bien à l'oléate d'éthyle.

Vérification de la position de la double liaison :

La molécule a été dérivée par la méthode des diméthyl disulfures qui permet de fixer la double liaison. Cette technique qui est couramment utilisée pour les esters méthyliques d'acides gras (Christie, www.lipid.co.uk) a également été employée pour l'analyse des hydrocarbures insaturés (Francis, 1981 et Paulmier, 1994).

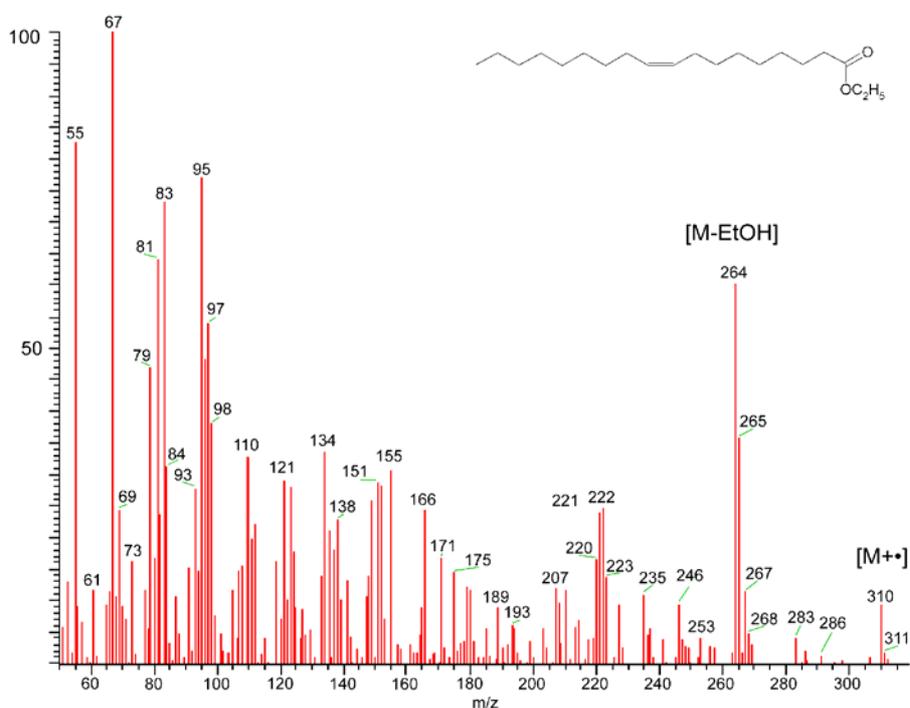


Figure 26 : Spectre de masse de l'oléate d'éthyle.

Par l'addition sur des alcènes de diméthyl disulfure ((CH₃)₂S₂ = DMDS) en excès, l'iode servant de catalyseur, les doubles liaisons s'ouvrent et il y a ajout de groupements SCH₃. Dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse, sous l'impact des électrons, la molécule se scinde entre les groupements additionnés (voir figure 26).

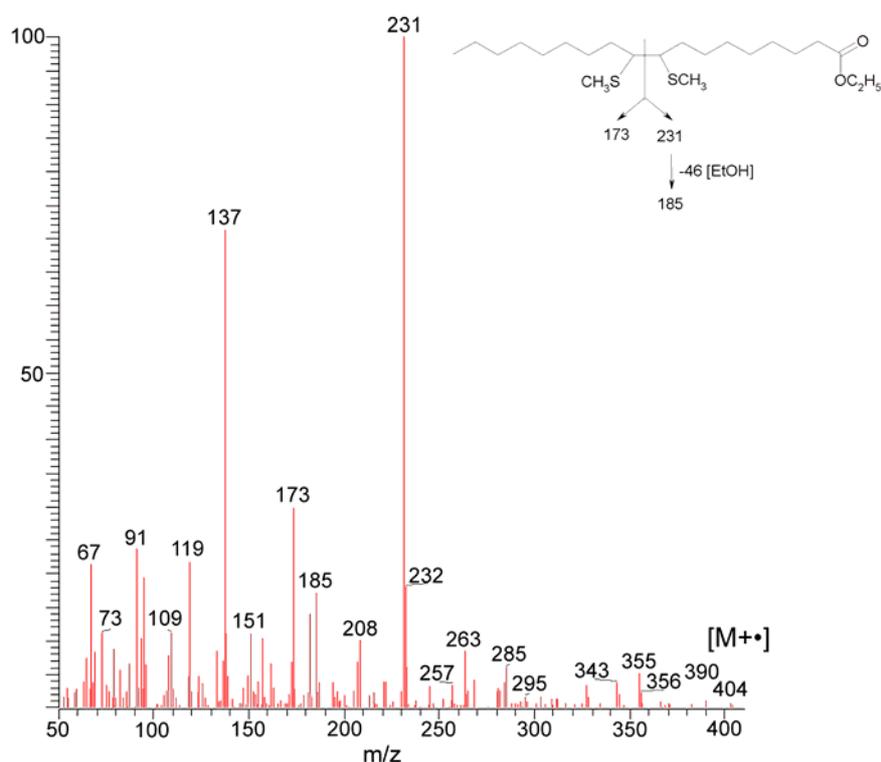


Figure 27 : Spectre de masse de l'oléate d'éthyle après dérivation par la méthode des diméthyl disulfures

Nous avons confirmé que la double liaison correspondait bien à celle de l'oléate d'éthyle, l'insaturation se trouvant entre les deux atomes de carbone 9 et 10

Après avoir repéré la position de la double liaison, nous avons cherché à confirmer sa stéréochimie. En effet, la stéréochimie de la double liaison de l'oléate d'éthyle est cis,

son isomère trans est l'oléate d'éthyle. La séparation des deux isomères a été analysée et confirmée dans nos conditions d'analyses (temps de rétention de l'oléate d'éthyle : 20.03 et temps de rétention de l'oléate d'éthyl : 20.13) et par conséquent nos extraits contiennent bien de l'oléate d'éthyle.

Ainsi, les analyses chimiques nous ont permis de confirmer que le pic retrouvé en CPG et en CPG/SM est bien de l'oléate d'éthyle. Nous pouvons maintenant quantifier les molécules obtenues.

II.1.6. Quantification

La méthode de quantification est calculée en tenant compte de la différence de coefficient de réponse. Pour cela, on injecte un mélange de référence contenant les esters d'acides gras recherchés et les standards internes, chacun en quantité connue. La formule de quantification est la suivante :

$$C_X = \frac{C_{OE\ ref} \quad A_{SI\ ref}}{C_{SI\ ref} \quad A_{OE\ ref}} \times \frac{C_{SI\ ech}}{A_{SI\ ech}} \quad A_X$$

C_X = quantité du composé inconnu X

$C_{OE\ ref}$ = quantité connue d'oléate d'éthyle du mélange de référence

$C_{SI\ ref}$ = quantité connue du standard interne (Cis-10-pentadécénoate de méthyle) du mélange de référence

$C_{SI\ ech}$ = quantité connue du standard interne présent dans l'échantillon

A_X = aire du pic du composé inconnu X

$A_{OE\ ref}$ = aire du pic de l'oléate d'éthyle du mélange de référence

$A_{SI_{Tech}}$ = aire du pic du standard interne présent dans l'échantillon

$A_{SI_{ref}}$ = aire du pic du standard interne du mélange de référence

II. 2. Résultats

L'expérience correspond à la quantification des esters d'acides gras dans 5 échantillons de 10 nourrices et 5 échantillons de 10 butineuses.

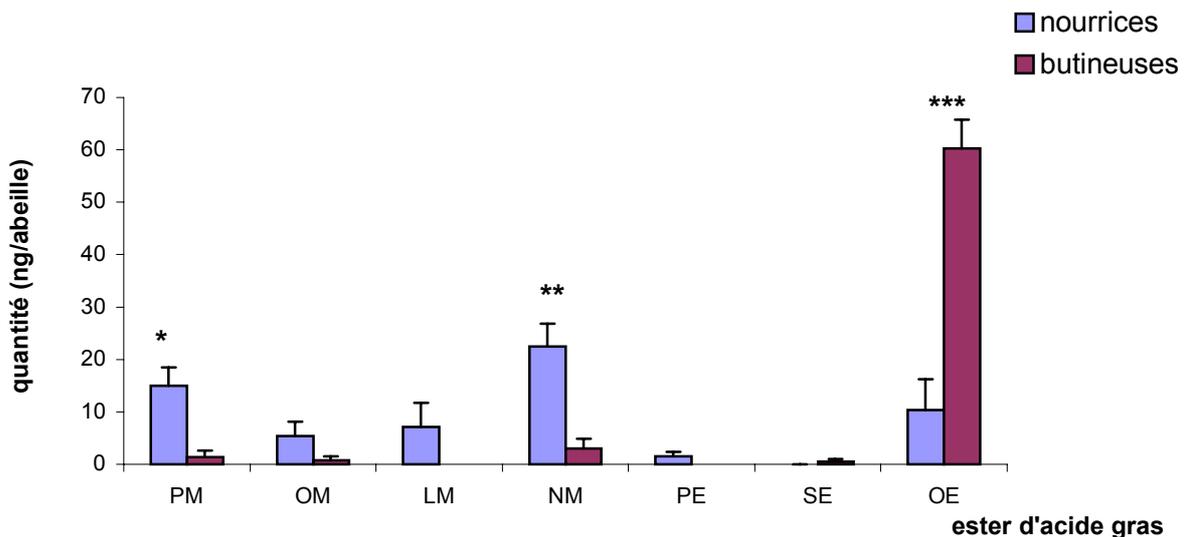


Figure 28: Quantités d'esters d'acides gras chez les nourrices et les butineuses.

Moyenne des 5 échantillons.

Les initiales des esters sont expliquées dans le tableau 11.

Les étoiles indiquent des différences significatives entre le 2 groupes nourrices et butineuses

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ et *** : $P < 0.001$ (test de Mann-Whitney).

Les nourrices renferment une gamme plus variée d'esters d'acides gras que les butineuses. Les différences de quantités entre les deux groupes d'abeilles sont toujours

significatives (test de Mann-Whitney, $P < 0.0001$). Les nourrices possèdent des quantités plus importantes de palmitate de méthyle (14.94 ng/abeille contre 1.33 ng/abeille chez les butineuses), d'oléate de méthyle (5.3ng/abeille contre 0.73 ng/abeille) et de linoléate de méthyle (22.48 ng/abeille contre 3.02 ng/abeille).

Par contre, un ester d'acide gras, l'oléate d'éthyle, prédomine chez la butineuse. En effet, cette molécule est 5 fois plus abondante chez les butineuses que chez les nourrices (60.32 ng/abeille contre 10.33 ng/abeille). Les deux chromatogrammes en phase gazeuse obtenus à partir d'extraits de 10 nourrices et de 10 butineuses révèle bien une différence sur un pic dont le temps de rétention correspond à l'oléate d'éthyle (voir figures 29 et 30).

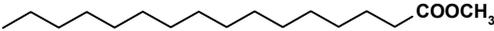
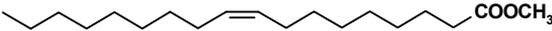
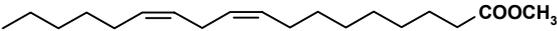
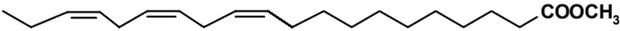
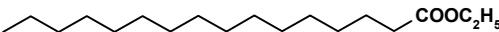
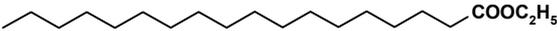
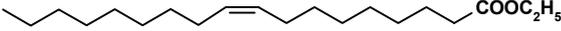
PM = Palmitate de méthyle hexadécanoate de méthyle	
OM = Oléate de méthyle (Z)-9-octodécénoate de méthyle	
LM = Linoléate de méthyle (Z,Z)-9,12-octadécadiénoate de méthyle	
NM = Linoléate de méthyle (Z,Z,Z)-9,12,15-octadécatriénoate de méthyle	
PE = Palmitate d'éthyle hexadécanoate d'éthyle	
SE = Stéarate d'éthyle octadécanoate d'éthyle	
OE = Oléate d'éthyle (Z)-9-octadécénoate d'éthyle	

Tableau 11 : Esters méthyliques et éthyliques d'acides gras retrouvés chez les nourrices ou les butineuses.

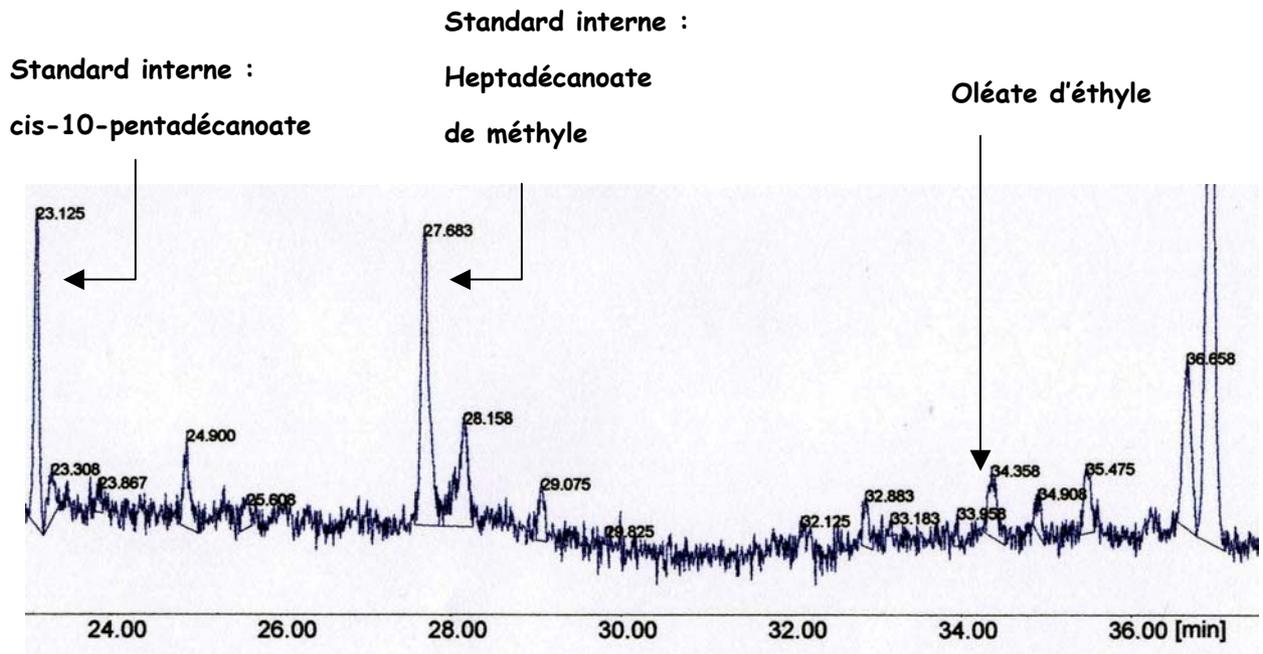


Figure 29 : Chromatogramme en phase gazeuse d'extraits totaux de 10 nourrices

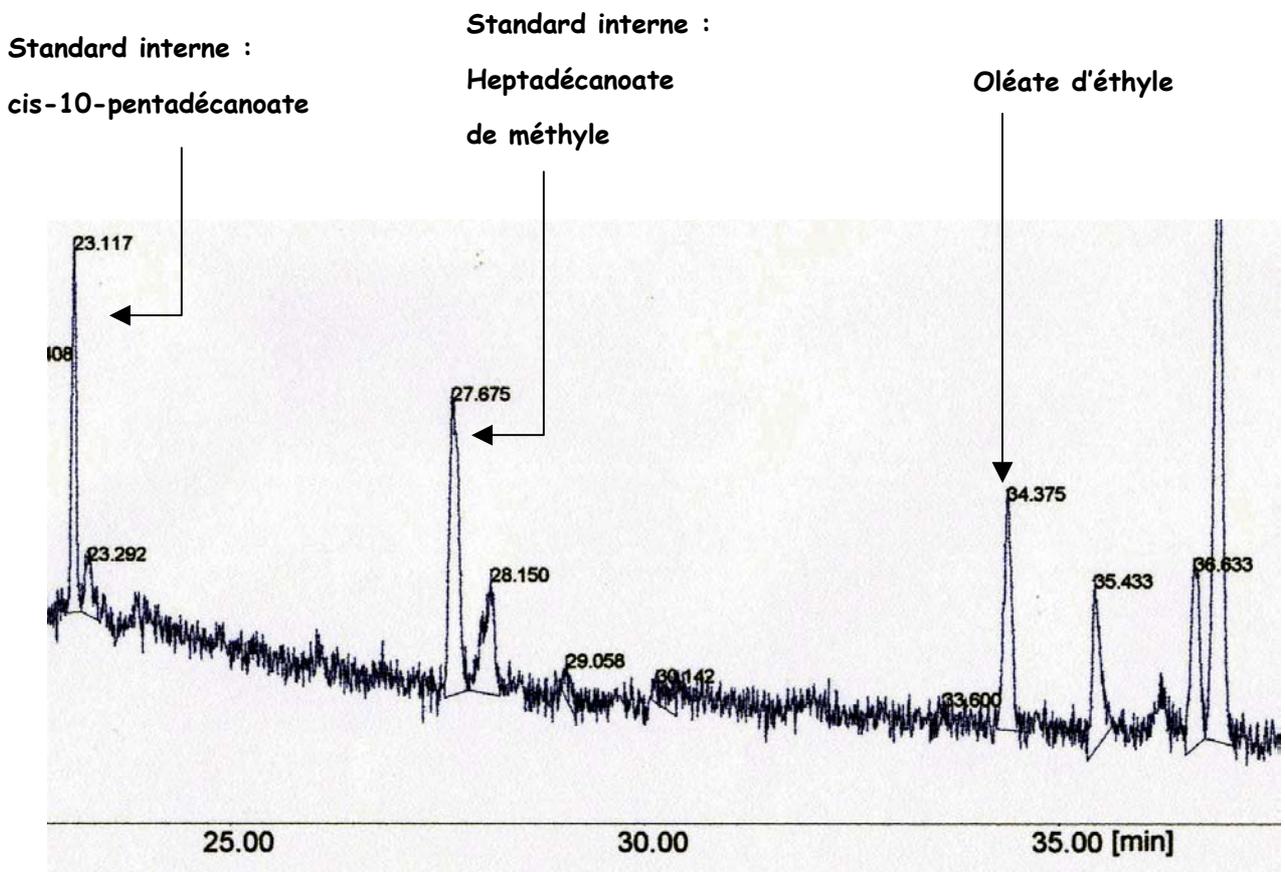


Figure 30 : Chromatogramme en phase gazeuse d'extraits totaux de 10 butineuses

II.3. Discussion

Ce premier résultat de comparaison des profils chimiques d'esters d'acides gras, met en évidence une prépondérance de l'oléate d'éthyle chez la butineuse par rapport à la nourrice. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse que l'oléate d'éthyle pourrait être impliqué dans l'inhibition exercée par les butineuses. En effet, il fait bien partie du bouquet des 10 esters de la phéromone de couvain qui inhibe le développement comportemental des jeunes ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001). De plus, l'oléate d'éthyle possède une action modificatrice sur les nourrices en stimulant la synthèse protéique de leurs glandes hypopharyngiennes (Mohammedi *et al.*, 1996). Or ces glandes qui produisent la nourriture destinée aux larves sont associées à un taux d'hormone juvénile bas chez ces mêmes ouvrières. Ces divers facteurs contribuent au maintien du stade de nourrice. L'effet modificateur que nous voulons identifier est similaire car il s'agit d'une inhibition du développement comportemental des ouvrières empêchant tout butinage précoce et maintenant donc les ouvrières au nid. L'oléate d'éthyle pourrait par conséquent faire partie de cette l'inhibition exercée cette fois-ci non pas par les immatures mais par les ouvrières âgées de la colonie.

L'oléate d'éthyle est prédominant chez la butineuses, mais où est-il localisé chez l'abeille ? La réponse à une telle question nous apporterait de plus amples informations sur le mode éventuel de transmission de la molécule et nous permettrait de réaliser de meilleurs dosages en GC. C'est ce que nous avons tenté de faire dans l'étude qui suit.

III. Quantification de l'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps des nourrices et des butineuses

L'objectif est de localiser l'oléate d'éthyle chez les ouvrières. Pour cela, la molécule est quantifiée dans différentes régions du corps des abeilles. Le protocole de broyage des parties d'abeilles puis celui de purification sont similaires à ceux de la première étude. De plus, les paramètres d'injection en CPG puis en CPG-SM restent inchangés. Comme précédemment, les esters sont identifiés par leur LEC et quantifiés de la même façon.

Dans cette partie, trois études complémentaires vont être décrites. Tout d'abord on recherche l'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps des butineuses. Ces résultats nous ont conduit à refaire des expériences similaires mais en mesurant l'oléate d'éthyle plus précisément dans l'abdomen des butineuses. Cette fois-ci, les quantités trouvées sont comparées à celles obtenues dans des régions identiques du corps de nourrices. Enfin, dans la troisième étude nous avons analysé les taux d'oléate d'éthyle dans le nectar et dans les pelotes de pollen des butineuses.

III.1. Quantification dans différentes régions du corps des butineuses

Tout d'abord, on recherche l'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps des butineuses, la tête, le thorax et l'abdomen ainsi que dans les pattes et les pelotes de pollen. Chaque échantillon correspond à la dissection de 10 individus.

III.1.1. Résultats

L'oléate d'éthyle a été quantifié sur 6 échantillons de butineuses.

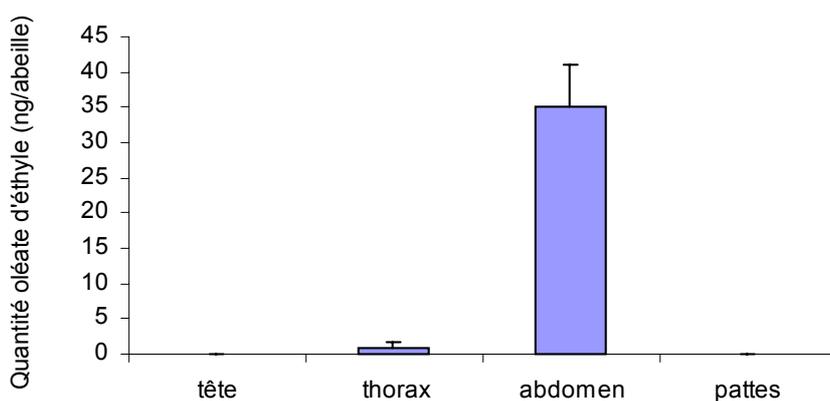


Figure 31 : Quantité d'oléate d'éthyle dans différentes régions du corps d'abeilles butineuses.

Moyenne des 6 échantillons.

Résultats représentant la moyenne des 6 séries

Les résultats de quantification d'oléate d'éthyle chez les butineuses montrent clairement que cette molécule se concentre dans l'abdomen des abeilles (35.2ng/abeille en moyenne). La variabilité inter série est toutefois importante, les quantités d'OE s'échelonnant de 18ng/abeille à 52ng/abeille.

Dans 1 série sur 5, l'OE est présent dans le thorax (4.7ng/abeille). Dans les 5 séries, aucune trace de OE n'est détectée dans la tête et dans les pattes (tableau des données brutes).

III.1.2. Discussion

Les résultats de quantification de OE dans les quatre parties du corps de la butineuse, la tête, le thorax, l'abdomen et les pattes, montrent clairement que la molécule se concentre dans l'abdomen.

La seconde étape a pour but de localiser l'oléate d'éthyle au niveau de l'abdomen. Pour cela, différentes parties du corps des butineuses et de nourrices ont été analysées.

III.2. Comparaison dans les régions du corps de butineuses et de nourrices

La recherche de l'oléate d'éthyle a été réalisée dans différentes parties du corps des butineuses et des nourrices. Les résultats précédents ont montré une forte concentration au niveau de l'abdomen des butineuses, nous avons donc mesuré l'oléate d'éthyle au niveau du tube digestif qui occupe une grande part de l'abdomen. Le jabot a été isolé du reste du tube digestif. Les différentes parties testées sont :

-la tête

-le thorax

-le jabot

-le reste du tube digestif (intestin et rectum)

-le reste de l'abdomen

Les butineuses de retour de butinage sont capturées alors qu'elles tentent de rentrer dans la colonie, les butineuses chargées de pollen sont prélevées pour cette étude. Les nourrices sont collectées à l'intérieur de la colonie alors qu'elles s'occupent du couvain (voir partie II.1.1.). Les nourrices et les butineuses pollen sont donc différenciées en fonction de leur activité et leur âge est inconnu.

Chaque échantillon correspond à la même partie du corps de 10 butineuses ou à 10 nourrices.

Les mesures d'oléate d'éthyle ont été faites sur 5 échantillons de butineuses et 5 échantillons de nourrices.

III.2.1. Résultats

Les résultats sont présentés sur la figure 32.

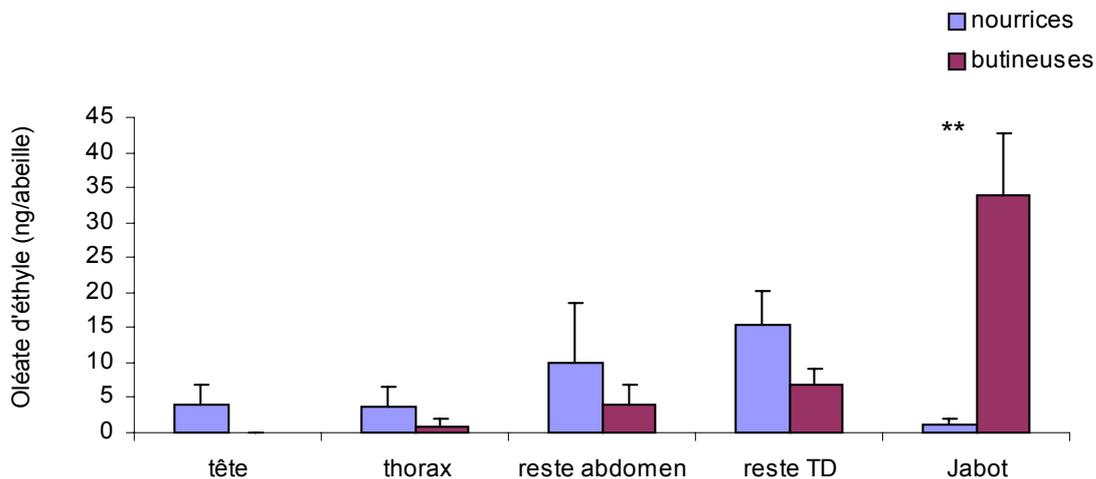


Figure 32 : Quantité d'oléate d'éthyle dans les différentes régions du corps de nourrices et de butineuses.

Moyennes des 5 échantillons.

Reste TD = reste du tube digestif après dissection du jabot.

Reste abdomen = reste de l'abdomen après dissection du jabot et du reste du TD.

** = $P < 0.01$ (Test de Mann-Whitney)

Chez les nourrices comme chez les butineuses, l'abdomen renferme la plus grande quantité d'oléate d'éthyle. Cependant cette molécule se retrouve en plus grande concentration dans le jabot des butineuses 33.8 ng/abeille en moyenne contre 1.2ng/abeille dans le jabot des nourrices. Cette différence est très significative (test de Mann-Whitney, $P=0.008$).

Chez les nourrices, la plus forte proportion d'OE se trouve dans le reste du tube digestif (15.2 ng/abeille). Même si cette valeur est supérieure à celle dans le reste du tube

digestif de butineuses (6.9 ng/abeille), la différence n'est pas significative (test de Mann-Whitney, $P=0.46$). De la même façon, le reste de l'abdomen d'une nourrice contient en moyenne plus d'oléate d'éthyle que celui d'une butineuse, 9.8ng d'oléate d'éthyle contre 4ng, mais cette différence est non significative (test de Mann-Whitney, $P=0.911$). La tête et le thorax d'une nourrice possèdent également de l'OE : 4.1ng et 3.8ng respectivement.

A côté de l'oléate d'éthyle, les autres esters d'acides gras, composants du bouquet phéromonal de couvain, ont été aussi quantifiés dans chacune des parties. Les deux tableaux suivants (tableaux 12 et 13) indiquent les quantités d'esters d'acides gras présents chez les butineuses et chez les nourrices (en ng/abeille), par échantillon.

extrait	partie	PE	SM	OM	OE	NM
échantillon 1	tête	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	4,73	-
	jabot	-	-	-	24,25	-
	reste TD	-	-	-	4,5	-
	reste abdo	-	-	-	-	-
échantillon 2	tête	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	3,54	49,17	-
	reste TD	-	-	-	4,16	-
	reste abdo	-	-	-	-	-
échantillon 3	tête	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	-	60,4	-
	reste TD	-	-	-	14,24	-
	reste abdo	7,35	-	-	14,89	-
échantillon 4	tête	-	-	-	-	5,61
	thorax	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	-	18,04	-
	reste TD	-	-	-	9,04	-
	reste abdo	11,65	2,04	-	-	-
échantillon 5	tête	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	-	17,34	-
	reste TD	-	-	1,26	2,79	-
	reste abdo	-	-	-	4,84	-

Tableau 12 : Quantités en ester d'acides gras chez les butineuses.

Résultat par échantillon.

Les quantités sont exprimées en ng/abeille

- = quantité non détectée.

Reste TD = reste du tube digestif

reste abdo = reste de l'abdomen après dissection du tube digestif

extrait	partie	PM	PE	SM	SE	OM	OE	LM	NM	NE
échantillon 1	tête	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	-	-	-	3,94	-	-	-
	reste TD	15,05	-	-	-	5,82	8,54	-	27,02	-
	reste abdo	-	-	-	-	-	5,72	-	-	-
échantillon 2	tête	-	1,34	-	-	-	6,88	-	-	-
	thorax	-	3,72	-	-	-	14,68	-	-	3,14
	jabot	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	reste TD	7,87	5,54	5,05	-	10,78	32,07	6,55	7,12	20,37
	reste abdo	-	-	0,91	-	-	40,62	-	-	46,57
échantillon 3	tête	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-	-	-	-	2,38
	jabot	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	reste TD	11,88	-	2,48	-	32,74	7,5	3,06	20,53	-
	reste abdo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
échantillon 4	tête	-	-	-	-	-	13,47	-	-	-
	thorax	-	-	-	-	-	4,52	-	-	-
	jabot	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	reste TD	19,22	5,72	14,13	-	58,04	15,95	22,76	13,41	-
	reste abdo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
échantillon 5	tête	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	thorax	12,89	68,66	-	27,58	-	-	-	-	-
	jabot	-	-	-	-	-	2,08	-	-	-
	reste TD	-	-	-	-	-	13,18	-	-	-
	reste abdo	-	-	-	-	-	2,92	-	-	-

Tableau 13 : Quantités en ester d'acides gras chez les nourrices.

Résultat par échantillon.

Les quantités sont exprimées en ng/abeille

- = quantité non détectée.

Reste TD = reste du tube digestif

Reste abdo = reste de l'abdomen après dissection du tube digestif

Chez les butineuses, le seul composé que l'on retrouve dans les 5 échantillons est l'oléate d'éthyle. Il est présent à chaque fois dans le jabot et dans le reste du tube digestif. Mais la quantité de OE est toujours plus importante dans le jabot. La différence de proportion est variable entre le jabot et le reste du tube digestif, allant de 2 fois plus de OE dans le jabot que dans le reste du TD dans l'échantillon 4 à 12 fois dans l'échantillon 2. Par contre, chez les nourrices l'OE est présent en faible quantité au niveau du jabot dans 2 échantillons sur 5 et dans des proportions plus grandes au niveau du reste du tube digestif dans les 5 échantillons.

Les nourrices possèdent une gamme plus large d'esters d'acides gras que les butineuses (voir tableaux 13 et 14 et figure 33). En effet, chez ces dernières, seules quelques traces de palmitate d'éthyle ont été détectées dans le reste de l'abdomen dans 2 échantillons sur 5, d'oléate de méthyle dans le jabot (1 échantillon sur 5) et le reste de TD (1 échantillon sur 5) et enfin une trace de stéarate de méthyle dans le reste de l'abdomen des butineuses dans un seul échantillon. En revanche, chez les nourrices, le reste du tube digestif renferme plusieurs esters d'acides. Dans 4 échantillons sur 5 on retrouve le palmitate de méthyle dans des proportions allant de 8ng à 19ng par abeille (en moyenne, 10.8ng/abeille), l'oléate de méthyle (entre 6ng et 58 ng par abeille en moyenne 21.5ng), le linoléate de méthyle (entre 7 et 27 ng par abeille, en moyenne : 13.6ng). D'autres composés se retrouvent moins constamment et dans des quantités plus faibles comme le linoléate de méthyle ou le stéarate de méthyle (dans 3 échantillons sur 5) ou le palmitate d'éthyle dans 2 échantillons (voir figure 33).

Dans l'échantillon 5, le thorax contient 3 esters (PM, PE et SE), PE et SE présentent de fortes quantités que l'on ne retrouve pas ailleurs.

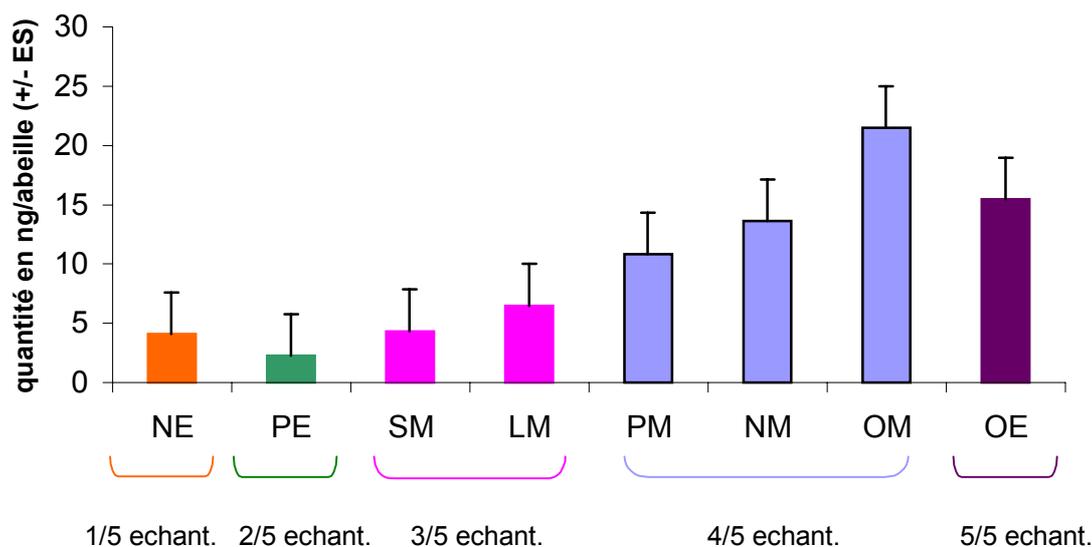


Figure33 : Esters d'acides gras retrouvés dans le reste du tube digestif des nourrices.
Moyenne des 5 échantillons.

PM = Palmitate de méthyle

hexadécanoate de méthyle

OM = Oléate de méthyle

(Z)-9-octodécénoate de méthyle

LM = Linoléate de méthyle

(Z,Z)-9,12-octadécadiénoate de méthyle

NM = Linolénate de méthyle

(Z,Z,Z)-9,12,15-octadécatriénoate de

PE = Palmitate d'éthyle

hexadécanoate d'éthyle

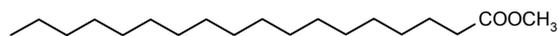
SE = Stéarate d'éthyle

octadécanoate d'éthyle

OE = Oléate d'éthyle

(Z)-9-octadécénoate d'éthyle

SM = Stéarate de méthyle



octadécanoate de méthyle

NE = Linolénate d'éthyle

(Z,Z,Z)-9,12,15-octadécatriénoate d'éthyle

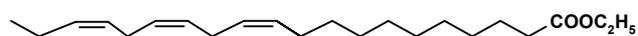


Tableau 14 : Esters présents dans le reste du tube digestif des nourrices.

III.2.2. Discussion

Ces premiers résultats montrent que c'est au niveau du jabot des butineuses que l'on retrouve la plus forte quantité d'oléate d'éthyle. Chez les nourrices, l'OE n'est pas présent d'une façon spécifique dans l'abdomen. En effet, la plus forte proportion d'OE chez la nourrice se retrouve dans le reste du tube digestif mais cette valeur n'est pas différente de celle dans le reste du tube digestif des butineuses.

Il existe cependant pour les 5 échantillons de jabot de butineuses comme pour les 5 échantillons de reste du TD de nourrices une forte variabilité de quantité de OE. Chez les nourrices, la variabilité des résultats peut s'expliquer en partie par la source d'incertitude lors du prélèvement. En effet, toutes les ouvrières étant morphologiquement semblables, celles supposées être nourrices sont prélevées sur un cadre de couvain mais leur âge ainsi que leur fonction réelle restent inconnus. Par contre, la tâche des butineuses est certaine car nous avons collecté des butineuses rentrant à la colonie, chargées de pelotes de pollen ; Mais là encore nous ne connaissons pas leur âge.

De plus, la quantité de molécules n'a pas été calculée par individu mais pour 10 abeilles afin de pouvoir détecter tous les esters en CPG/SM. Si une abeille présente une quantité atypique d'un des esters, celui-ci va être surestimé ou sous-estimé par rapport à sa valeur réelle.

A côté de l'oléate d'éthyle, d'autres esters d'acides gras ont été retrouvés spécifiquement dans le tube digestif des nourrices. Les 6 esters quantifiés dans la nourrice entière (voir étude précédente sur la comparaison des quantités d'esters entre nourrices et butineuses) sont retrouvés ici. Les trois prépondérants chez la nourrice, le NM (22.5ng/abeille), le PM (14.9) et l'OM (5.3) sont là encore les plus importants même si les quantités diffèrent de la première étude. On trouve en moyenne une forte concentration d'OM (21.4ng/abeille), puis 13.6ng/abeille de NM et enfin 10.8ng/abeille de PM. Par conséquent, on retrouve plus d'OM dans le reste du tube digestif de la nourrice que dans l'individu entier.

De plus, le reste du tube digestif de nourrice contient deux autres esters qui n'ont pas été quantifiés chez la nourrice, le SM et le NE (voir tableau 14).

Cette composition d'esters différente en quantité et en qualité entre le reste du tube digestif de la nourrice et l'individu entier, peut s'expliquer par la plus grande précision de dosage lorsque l'on travaille sur les parties du corps des abeilles par rapport à l'individu entier.

Ces esters d'acides gras font partie du bouquet phéromonal émis par le couvain (Le Conte *et al.* 1989, 1990), qui a de multiples effets incitateurs et modificateurs sur les abeilles. Trouiller (1993) quantifie ces esters de couvain chez les ouvrières adultes de 1 et 5 jours. Les esters sont présents en très faibles quantités à la fois chez les ouvrières émergentes que chez les ouvrières de 5 jours et les différences ne diffèrent pas significativement. Cependant chez les abeilles âgées d'un jour, l'oléate d'éthyle correspond au composé majoritaire (6ng/abeille) suivi par l'oléate de méthyle (4ng/abeille) et le palmitate d'éthyle (4ng/abeille). A 6 jours, le linoléate de méthyle est prédominant (4ng/abeille) suivi par le palmitate d'éthyle (3ng/abeille) et l'oléate d'éthyle (3ng/abeille).

Certains rôles des trois esters (NM PM et OM) retrouvés en quantités prépondérantes chez la nourrice, aussi bien dans l'individu entier que dans le reste du tube digestif, sont connus. Le palmitate de méthyle augmente le poids des larves de reine (Le Conte *et al.*, 1995). Les trois molécules associées au LM, jouent un rôle dans l'operculation des cellules de couvain par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1990). Le NM, l'OM et le LM sont présents sur la cuticule des larves de reines et sont impliqués dans la reconnaissance des cellules royales par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1994). Le PM et l'OE stimulent la synthèse protéique des glandes hypopharyngiennes des nourrices produisant les aliments pour le couvain (Mohammedi *et al.*, 1996). Le NM et le PE inhibent le développement ovarien des ouvrières (Mohammedi *et al.*, 1998).

D'autres esters, présents en moindre quantité dans le reste du tube digestif de nourrice ont des effets connus chez les larves. Par exemple, le stéarate de méthyle augmente

l'acceptation des cellules de reines par les ouvrière, le linoléate de méthyle stimule le dépôt de la gelée royale dans les cellules de couvain (Le Conte *et al.*, 1995).

La présence de ces différents esters dans le tube digestif des nourrices, laisse supposer que les molécules seraient transmises des larves aux nourrices. Le lieu de production et de stockage des esters d'acides gras chez la larve restent encore inconnus mais une équipe vient de caractériser une protéine « carrier » susceptible donc de véhiculer la phéromone jusqu'au lieu de sécrétion.(Briand *et al.*, 2002). On ne connaît pas non plus le mode de transmission des molécules des larves aux nourrices, peut-être par contact cuticulaires ou par trophallaxie.

III.3. Quantification de l'oléate d'éthyle dans le nectar et le pollen des butineuses

Afin de savoir si l'oléate d'éthyle pourrait être d'origine exogène à l'abeille, nous avons quantifié cette substance dans le pollen et le nectar des butineuses.

III.3.1. Matériel et méthodes

Prélèvement du nectar :

10 butineuses sont prélevées lorsqu'elles rentrent dans la colonie en apposant une grille pour bloquer l'entrée de la ruche. L'abdomen de chacune est comprimé avec des pinces de façon à faire ressortir tout le nectar par voie buccale. Les gouttes de nectar ainsi régurgitées sont prélevées à l'aide d'un micro-capillaire et déposées dans un tube contenant 1 ml d'iso-hexane et 100 μ l du mélange des trois standards internes (le cis-10-

pentadécanoate de méthyle, le heptadécanoate de méthyle et la nonadécanoate de méthyle). Le tube contient donc le nectar régurgité de 10 abeilles.

Les abeilles sont ensuite placées à - 80°. Puis l'enveloppe du jabot vide est disséquée et placée dans un tube contenant 1 ml d'iso-hexane et 100 µl du mélange des trois standards internes. Le tube renferme donc l'enveloppe du jabot des 10 abeilles.

Prélèvement du pollen :

Les butineuses pollen de retour à la ruche sont capturées et placées à - 80°C. Les pelotes de pollen sont ensuite prélevées et déposées dans un tube contenant 1 ml d'iso-hexane et 100 µl du mélange des trois standards internes. Le tube contient les pelotes de pollen de 10 abeilles.

La procédure de quantification de l'oléate d'éthyle est similaire à celle employée dans les expériences décrites ci-dessus.(voir partie 6, chapitre II.1.).

Deux échantillons de nectar/enveloppe de jabot et 6 échantillons de pollen ont été analysés.

III.3.2. Résultats et discussion

Les deux échantillons de nectar régurgité ne contiennent pas d'oléate d'éthyle (voir figure 34). En revanche, une forte concentration se retrouve dans l'enveloppe du jabot dans les deux échantillons, en moyenne 41ng/abeille. Cette valeur est similaire à la quantité obtenue dans le jabot entier des butineuses dans l'expérience précédente (en moyenne : 34ng/abeille).

Les pelotes de pollen contiennent en moyenne 3.6ng/abeille d'OE, ce qui correspond à 1.8ng par pelote en moyenne (voir tableau 15). L'OE retrouvé dans le jabot pourrait donc provenir du pollen ingurgité par l'abeille. Cependant plusieurs auteurs ont montré que les butineuses ne consomment pas de pollen (Lindauer, 1952 ; Crailsheim *et al.*, 1992 ; Hrassnigg et Crailsheim, 1998). D'autres études indiquent que le pollen ingéré est très peu présent dans le jabot des ouvrières quel que soit leur âge (Crailsheim *et al.*, 1992) et l'intestin d'abeilles âgées de 24 ou 30 jours ne contient pas de pollen (Naiem *et al.*, 1999). Le pollen est nécessaire pour la croissance des ouvrières pendant les 6 à 8 premiers jours de leur vie adulte (Lindauer, 1952 ; Haydak, 1959, Crailsheim *et al.*, 1992).

Si l'oléate d'éthyle ne provient ni du nectar, ni du pollen, nous pouvons supposer que la molécule présente dans le jabot à une origine endogène à l'abeille.

Dans l'étude qui suit nous avons quantifié l'oléate d'éthyle dans le jabot et le reste du tube digestif d'abeilles d'âge connu et nous avons comparé deux races d'*Apis mellifera* : *ligustica* et *mellifera*.

	Pollen
Echantillon 1	10,36
Echantillon 2	0
Echantillon 3	0
Echantillon 4	0
Echantillon 5	0
Echantillon 6	11,1
Moyenne	3,58
ES	2,26

Tableau 15 : Quantification de l'oléate d'éthyle dans les pelotes de pollen de butineuses.

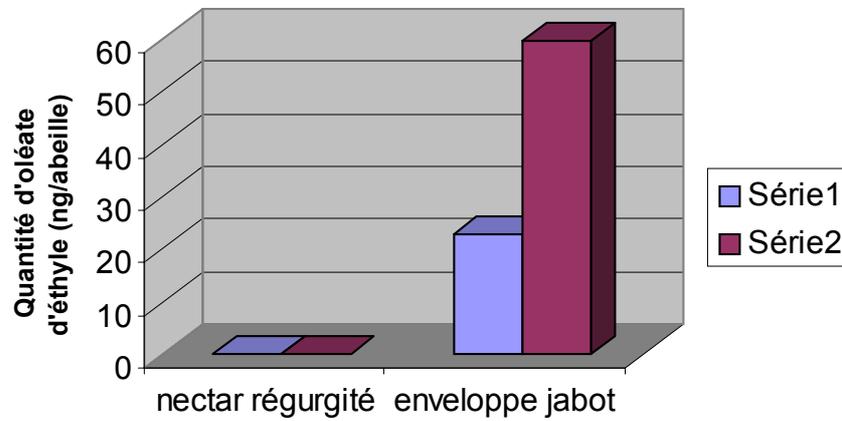


Figure 34 : Quantification de l'oléate d'éthyle dans le nectar et l'enveloppe du jabot de butineuses.

IV. Evolution de la quantité d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez deux races d'*Apis mellifera* L.

Dans cette seconde étude, l'oléate d'éthyle est quantifié en fonction de l'âge des ouvrières de deux races, *Apis mellifera mellifera* et *Apis mellifera ligustica*, car des expériences comportementales ont déjà mis en évidence un pouvoir inhibiteur supérieur des abeilles *ligustica* sur des individus plus jeunes de leur propre espèce. Si l'oléate d'éthyle est impliqué dans cette inhibition, des différences de quantités pourraient apparaître entre les deux races d'abeilles.

IV.1. Matériel et méthodes

IV.1.1. Matériel biologique

Des cadres de couvain prêt à éclore sont prélevés dans des colonies standards de l'une ou l'autre des deux races d'*Apis mellifera* L. et placés dans une étuve à 34°C. Les abeilles qui émergent dans les 24 heures sont alors âgées de un jour. Elles sont marquées d'un point de peinture sur le thorax avant d'être replacées dans leur colonie d'origine.

Les analyses chimiques sont effectuées sur des ouvrières âgées de 1 jour, 7 jours, 14 jours, 21 jours et 28 jours.

A partir de 28 jours de vie adulte, on observe des abeilles marquées à l'extérieur du nid. A cet âge, on a donc prélevé un groupe d'abeilles à l'intérieur et un lot de butineuses à l'extérieur en apposant une grille devant l'entrée de la ruche. Dans la première colonie

d'A. m. ligustica (série 1 et 2) et la première colonie *d'A. m. mellifera* (série 1 et 2) que nous avons utilisées, les quantifications ont été aussi réalisées sur des abeilles de 34 jours.

La détermination de la race a été effectuée par des analyses électrophorétiques qui permettent la migration d'une enzyme, la malate déshydrogénase, caractéristique de la race.

Deux colonies *d'A.m. ligustica* et deux colonies *A.m. mellifera* ont été utilisées pour cette étude. Pour chaque colonie, deux répétitions de l'expérience ont été effectuées. Nous avons donc effectué 4 séries au total.

IV.1.2. Echantillons

Chaque échantillon regroupe 10 abeilles du même âge et de la même race provenant de la même colonie. En se basant sur les résultats de l'étude 1 nous avons limité l'analyse de l'oléate d'éthyle dans deux parties de l'abeille : le jabot et le reste du tube digestif.

IV.1.3. Extraction, fractionnement, injection en CPG et quantification

Depuis le broyage des abeilles jusqu'à l'étape de quantification de l'ester d'acide gras, tous les protocoles restent identiques à ceux des études précédemment décrites (voir chapitre II.1.).

IV.2. Evolution de la quantité d'oléate d'éthyle chez *A.*

m. ligustica

IV.2.1. Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge

L'effectif ($n = 4$) est insuffisant pour réaliser un traitement statistique des résultats. Nous avons choisi de représenter les résultats pour chaque série afin d'illustrer la grande variabilité inter série. La figure 35 représente la quantité moyenne des 4 séries d'oléate d'éthyle chez les ouvrières *ligustica* prélevées à l'intérieur de la ruche à des âges différents. La figure 36 montre le résultat de chaque série.

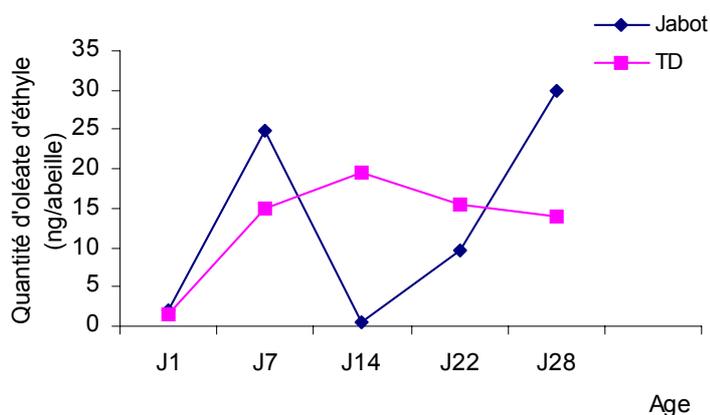


Figure 35 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières *A. m. ligustica* prélevées à l'intérieur de la ruche.

Moyenne des 4 séries

TD = reste du tube digestif après dissection du jabot

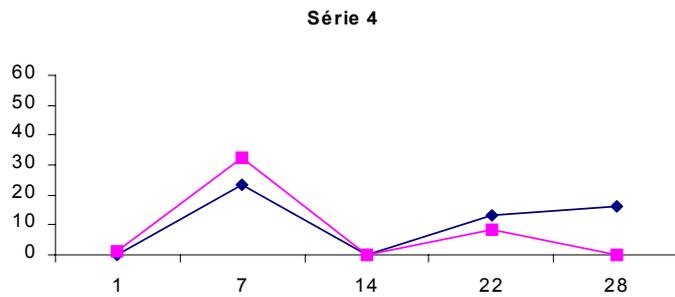
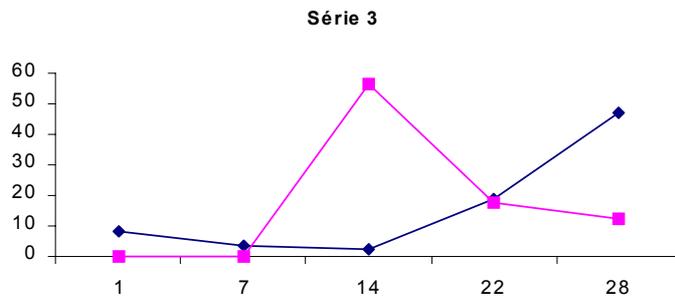
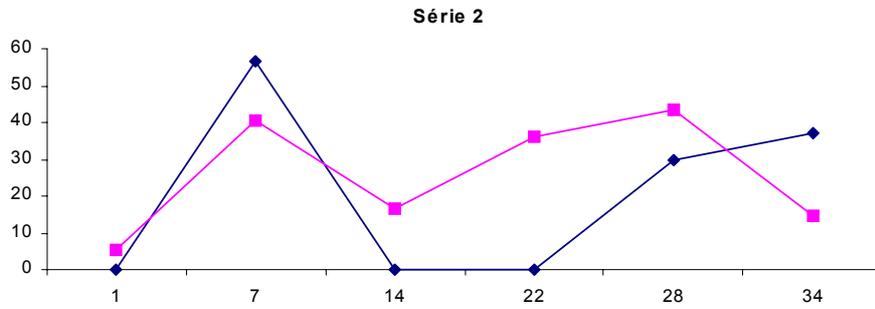
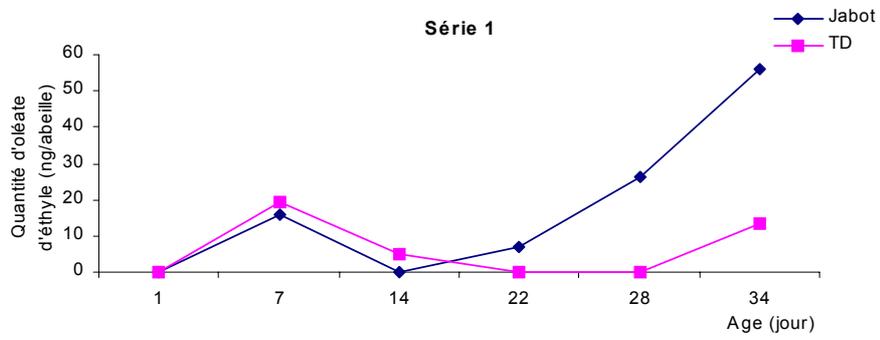


Figure 36 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières *A. m. ligustica* prélevées à l'intérieur de la ruche.

Résultats par série

TD = reste du tube digestif après dissection du jabot

Dans le jabot, la quantité d'oléate d'éthyle varie en fonction de l'âge de l'ouvrière. Alors qu'il y a très peu d'oléate d'éthyle (OE) à J1, en moyenne 2ng par abeille, on en retrouve une quantité plus importante à J7, 25ng par abeille en moyenne puis le taux de OE diminue à J14 (0.5ng/abeille en moyenne). A partir de cet âge on remarque une augmentation de OE dans le jabot des ouvrières en fonction de l'âge. En effet, à J22, le jabot contient en moyenne 10ng/abeille, à J28, 30ng/abeille pour les abeilles prélevées à l'intérieur de la colonie. Les deux premières séries vont jusqu'à 34 jours. On remarque qu'à cet âge, les abeilles possèdent une quantité encore plus importante d'oléate d'éthyle, 46ng/abeille en moyenne. La quantification de l'OE n'a pas été réalisée à 34 jours dans la seconde expérience car nous n'avons pas obtenu suffisamment d'individus.

On peut constater une forte variabilité dans les résultats entre les séries. Dans 2 séries sur les 4, les jabots des abeilles de 7 jours contiennent des taux forts de OE, dépassant les quantités retrouvées chez les abeilles les plus âgées. Dans la série 2, l'ouvrière de 7 jours renferme 56.5ng alors que l'abeille de 34 jours en possède seulement 37ng. De même, dans la série 4, l'abeille de 7 jours en possède 23ng et celle de 28 jours 16ng. A l'opposé, dans la série 3, il n'y a pas de pic à J7 mais une diminution de OE depuis J1 jusqu'à J14.

Cependant, dans toutes les séries, les quantités de OE dans le jabot à J14 et J22 sont toujours inférieures à celles des ouvrières les plus âgées (J28 ou J34).

Dans le reste du tube digestif, l'évolution de la quantité de OE au cours du temps varie d'une série à l'autre. Dans trois séries sur quatre, le taux de OE augmente entre J1 et J7 puis diminue jusqu'à J14 puis la quantité de OE évolue différemment en fonction des séries. Mais il n'y a pas de nette croissance en fonction de l'âge.

A J1 et J7, les quantités de OE dans le jabot sont très proches de celles dans le reste du tube digestif. Dans 2 séries les quantités à J14 sont supérieures dans le reste du tube digestif, notamment dans la série 3 où le pic de OE est très important (56.6ng/abeille).

Puis à partir de J22, les valeurs de OE sont plus basses dans le reste du tube digestif que dans le jabot dans 3 séries sur 4.

Dans les quatre séries, les quantités de OE sont toujours supérieures dans le jabot chez les abeilles les plus âgées (J34 ou J28).

On peut également constater que les valeurs de la série 4 sont plus faibles que celles des autres séries.

Enfin, les quantités d'oléate d'éthyle trouvées le premier jour de vie adulte varient entre 0 et 8.5ng/abeille ; Ces valeurs se rapprochent de celle trouvée par Touiller (1993). Ce dernier a quantifié les esters d'acides gras présents dans la phéromone de couvain chez l'ouvrière adulte *Apis mellifera* L de 1 et 5 jours. L'oléate d'éthyle apparaît comme l'ester majoritaire même si les quantités sont faibles : , 6ng/abeille à 1 jour et 3ng/abeille à 5 jours.

IV.2.2. Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'activité

Nous avons ensuite voulu savoir si des différences de quantité d'oléate d'éthyle existent chez des individus de même âge, (28 jours) mais exécutant une fonction différente au moment de la capture : à l'intérieur de la colonie ou de retour d'un butinage (voir figure 37).

*

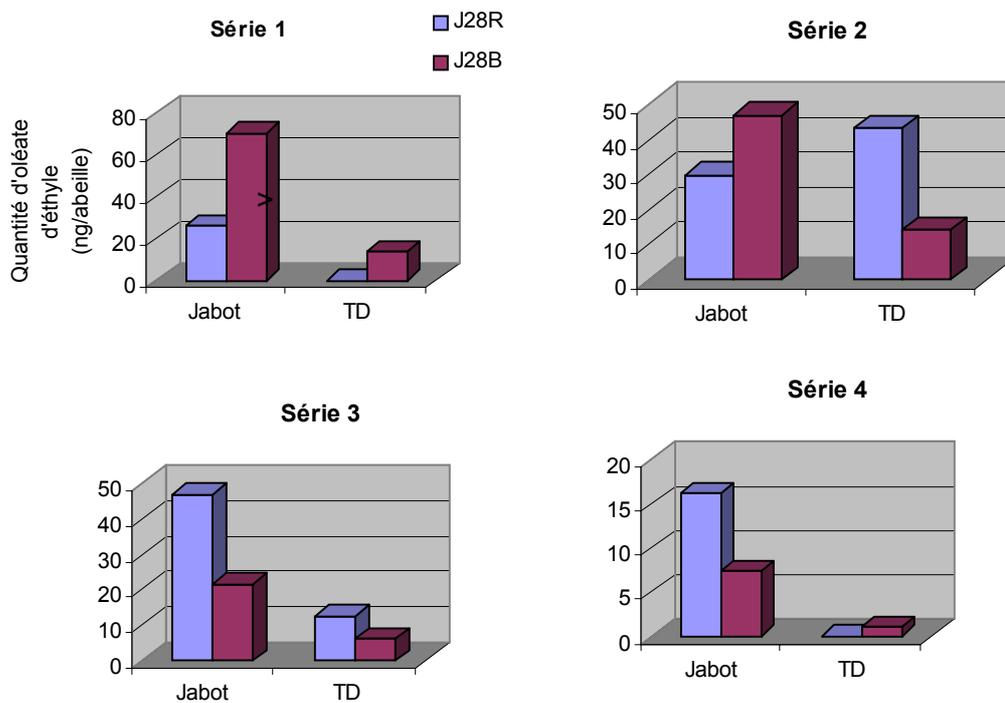


Figure 37 : Comparaison de la quantité d'oléate d'éthyle entre ouvrières *ligustica* de 28 jours prélevées à l'intérieur de la ruche et butineuses de 28 jours.

J28R = ouvrières de 28 jours dans la ruche

J28B = ouvrières de 28 jours butineuses

TD = reste du tube digestif après dissection du jabot

La butineuse renferme en moyenne dans son jabot 36.6 ng d'OE alors que la nourrice en contient 29.8 ng. Deux séries sur quatre indique cette différence, qui ne semble pas être significative.

Quelles que soient les abeilles, le tube digestif contient moins d'OE que le jabot dans trois séries sur 4. Une tendance ressort si on considère les moyennes des 4 séries, les abeilles à J28 prélevées à l'intérieur possèderaient plus de OE dans le reste du tube digestif que les butineuses (J28R=14.02ng/abeille et J28B=8.37ng/abeille). Cependant cette forte concentration de OE dans le reste du tube digestif des abeilles J28R n'existe que dans une seule série (série 2, 43.4ng/abeille).

IV.2.3. Discussion

Cette expérience de dosage de l'oléate d'éthyle en fonction de l'âge des abeilles *A. m. ligustica* montre que la quantité de la molécule augmente dans le jabot entre 14 et 28 jours et atteint à cet âge en moyenne 30 ng/abeille. Cette valeur est bien similaire à celle que l'on a retrouvée dans l'expérience précédente dans le jabot des butineuses *ligustica* d'âge inconnu. En revanche, dans le reste du tube digestif, le taux d'oléate d'éthyle n'augmente pas régulièrement avec l'âge de l'abeille. Après une croissance entre J1 et J14, le taux se stabilise autour de 16 ng/abeille entre 14 et 28 jours.

Ces résultats confirment bien ceux obtenus dans l'expérience précédente sur la mesure d'oléate d'éthyle chez des nourrices et des butineuses *ligustica* d'âge inconnu. Tout d'abord, l'oléate d'éthyle est prépondérant dans le jabot des abeilles les plus âgées, notamment chez les butineuses de 28 jours, et les quantités trouvées correspondent bien à celles de l'expérience précédente. De plus, les abeilles de 14 jours qui effectuent des travaux domestiques possèdent beaucoup moins d'oléate d'éthyle que les ouvrières plus âgées. A l'âge de 10 jours, les abeilles passent des activités de soins au couvain et à la reine vers les activités de construction du nid et de réception du nectar des butineuses (Winston, 1987). A 14 jours, elles sont donc dans leur phase de tâches domestiques et leur jabot ne contient plus d'oléate d'éthyle. Par contre, à 7 jours, les ouvrières sont nourrices, elles possèdent une forte quantité d'oléate d'éthyle (25 ng/abeille) très proche de celle des abeilles de 28 jours. Cette valeur ne correspond pas à celle retrouvée dans l'expérience de comparaison des nourrices et des butineuses d'âge inconnu (Partie 6 III.). Comment expliquer ce pic d'oléate d'éthyle à 7 jours ? Tout d'abord la courbe de mesure de l'oléate d'éthyle ne représente pas la production de la molécule par l'abeille mais la concentration dans son organisme. L'abeille âgée de 7 jours est dans sa phase de nourrissage du couvain, elle pourrait donc recevoir de l'oléate d'éthyle au contact des larves, qui elles sécrètent de l'oléate d'éthyle. Outre de multiples effets incitateurs sur les nourrices (Le Conte *et al.*, 1990, 1994, 1995), la phéromone larvaire agit également sur la physiologie des abeilles notamment en stimulant l'activité des glandes

hypopharyngiennes (Mohammedi *et al.*, 1996) et en inhibant le développement comportemental des ouvrières (le Conte *et al.*, 2001). Il semble alors normal d'observer des quantités importantes d'oléate d'éthyle chez les abeilles de 7 jours qui sont sous l'influence immédiate des larves.

Dans l'expérience précédente (Partie 6 III.), cette forte quantité d'oléate d'éthyle ne se retrouve pas chez la nourrice (qui est âgée de 7 jours). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude précédente, les nourrices ont été prélevées au hasard et que leur âge est inconnu. Si la majorité d'entre elles est plus âgée, la quantité moyenne d'oléate d'éthyle calculée est donc plus faible que la quantité mesurée à 7 jours.

Nous avons également quantifié l'oléate d'éthyle chez les abeilles de la race *mellifera*.

IV.3. Evolution de la quantité d'oléate d'éthyle chez *A. m. mellifera*

IV.3.1. Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge

Les résultats sont présentés pour chaque série.

Les graphes correspondent aux quantités d'oléate d'éthyle chez les ouvrières *mellifera* prélevées à l'intérieur de la ruche à des âges différents (figure 38).

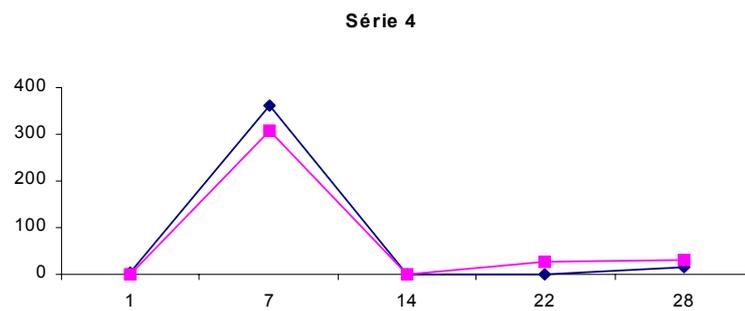
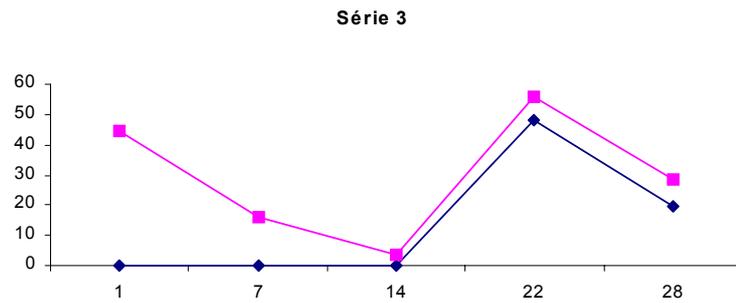
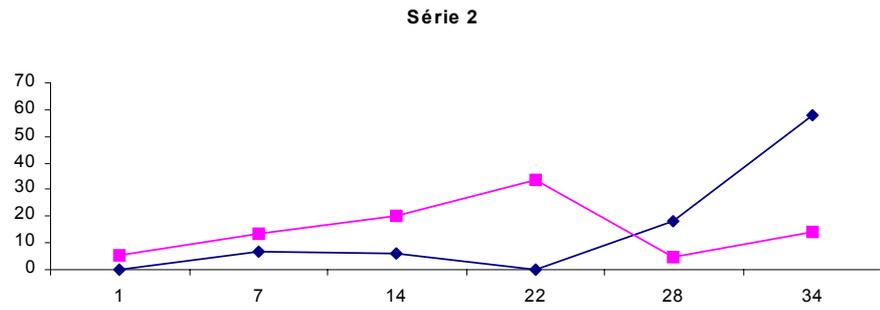
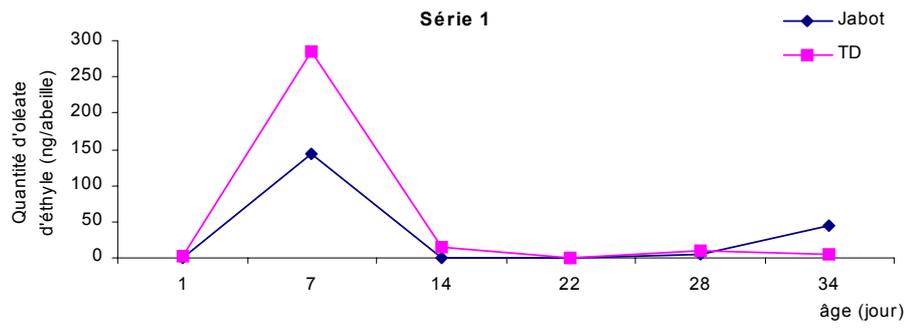


Figure 38 : Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge chez des ouvrières *A. m. mellifera* prélevées à l'intérieur de la ruche.

TD = reste du tube digestif après dissection du jabot

L'évolution de la quantité d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge n'est pas constante d'une série à l'autre aussi bien dans le jabot que dans le reste du tube digestif.

Dans le jabot dans les séries 1 et 4, les abeilles de 7 jours présentent un très fort pic de OE puis à J14 la valeur est nulle et elle reste faible à J22 et J28. Dans la série 2, OE augmente avec l'âge à partir de J22. Enfin, dans la série 3, l'évolution de la quantité de OE est tout autre : le taux est nul de J1 à J14 puis il augmente brutalement à J22 et diminue légèrement à J28.

Dans le reste du tube digestif l'évolution de la quantité de OE est similaire à celle dans le jabot dans 3 séries sur 4. On retrouve un pic de OE chez les abeilles de 7 jours dans les séries 1 et 4 et dans la série 1, la quantité d'OE dans le reste du tube digestif est 2 fois supérieure à celle dans le jabot.

Des différences de quantités de OE entre le reste du tube et le jabot existent dans la série 2 où l'augmentation de OE entre J22 et J28 dans le jabot s'accompagne d'une décroissance de OE dans le tube digestif. Toutefois, dans les trois autres séries, les taux de OE à 28 jours sont similaires dans les deux régions.

IV.3.2. Quantités d'oléate d'éthyle en fonction de l'activité

Comme dans l'expérience similaire avec les abeilles *ligustica*, nous avons quantifié les quantités d'oléate d'éthyle chez des individus de même âge, (28 jours) mais exécutant une fonction différente au moment de la capture : à l'intérieur de la colonie ou de retour d'un butinage (voir figure 39).

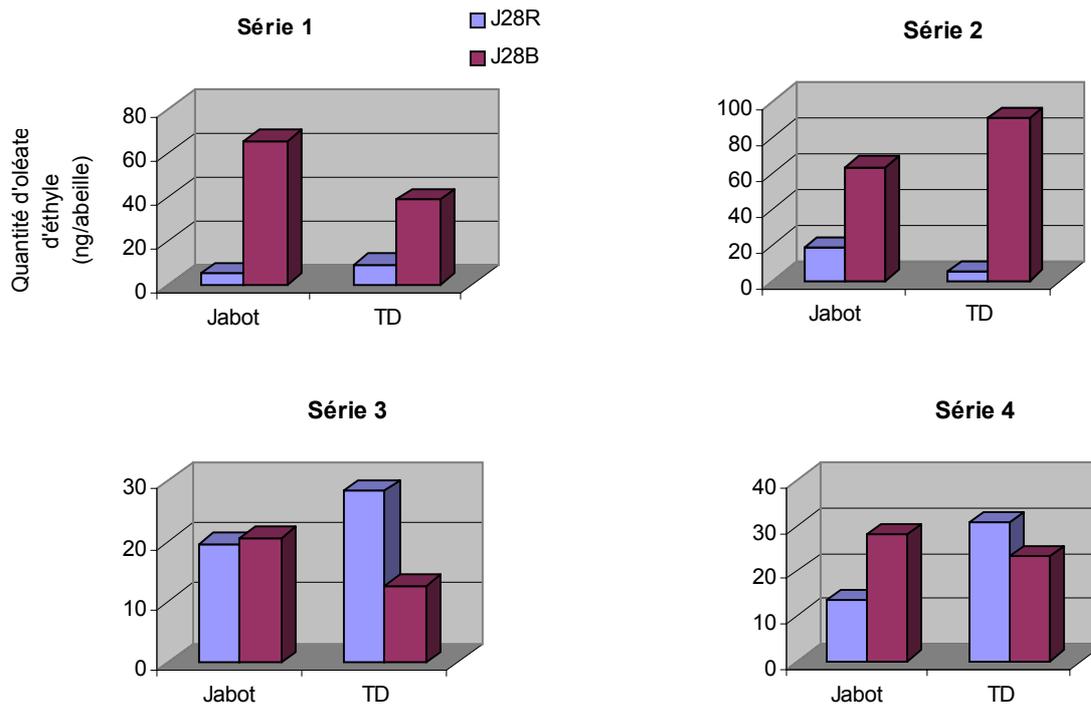


Figure 39 : Comparaison de la quantité d'oléate d'éthyle entre ouvrières *mellifera* de 28 jours prélevées à l'intérieur de la ruche et butineuses de 28 jours.

J28R = ouvrières de 28 jours dans la ruche

J28B = ouvrières de 28 jours butineuses

TD = reste du tube digestif après dissection du jabot

Si on considère les quantités de OE chez les butineuses âgées de 28 jours, le taux est plus fort dans le jabot dans 3 séries sur 4. Seule la série 2 montre une proportion de OE supérieure dans le reste du tube digestif (90 ng/abeille contre 63 ng/abeille dans le jabot). Chez les abeilles de 28 jours prélevées dans la ruche c'est le phénomène inverse qui s'observe : le reste du tube digestif renferme plus de OE dans 3 séries sur 4.

Si on compare les abeilles capturées à l'intérieur et les butineuses, la quantité de OE est toujours supérieure dans le jabot des butineuses. En revanche, les quantités de OE dans le reste du tube ne sont pas spécifiques d'un des deux groupes d'abeilles.

IV.3.3. Discussion

Chez *A. m. mellifera*, l'évolution de la quantité d'oléate d'éthyle n'est pas constante d'une série à l'autre. Il ne ressort aucune augmentation nette de la quantité de cette molécule en fonction de l'âge, l'oléate d'éthyle n'est pas prépondérant dans le jabot des abeilles les plus âgées et il n'existe pas de différences entre la concentration dans le jabot et le reste du tube digestif chez les abeilles de 28 jours. Dans deux séries, les quantités de OE dans le jabot des ouvrières âgées de 7 jours dépassent largement celles obtenues aux autres âges. Par exemple, dans la dernière série, cette valeur est plus de 12 fois supérieures à la concentration dans le jabot des abeilles de 28 jours supérieures.

Par conséquent, l'évolution de la quantité d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge n'est pas similaire entre les abeilles des races *ligustica* et *mellifera*. Chez les *A. m. ligustica*, la concentration d'oléate d'éthyle augmente dans le jabot entre 14 et 28 jours et cette molécule est prépondérante chez les abeilles les plus âgées. En revanche, cette caractéristique ne se retrouve pas chez les abeilles *mellifera* dans les quatre séries.

Ces résultats confirment nos travaux précédents sur la comparaison raciale du pouvoir inhibiteur des butineuses qui ont mis en évidence cette inhibition uniquement chez la race *ligustica*.

IV.4. Comparaison de la quantité d'oléate d'éthyle dans le jabot entre *A.m. ligustica* et *A.m. mellifera* de 28 et 34 jours

Les quantités d'oléate d'éthyle dans le jabot sont comparées entre les deux races chez les ouvrières prélevées dans la colonie à 28 et 34 jours et chez les butineuses de 28 jours.

IV.4.1. Résultats

Le graphe présente les moyennes des 4 séries pour les J28 et des deux séries pour les J34 (figure 40).

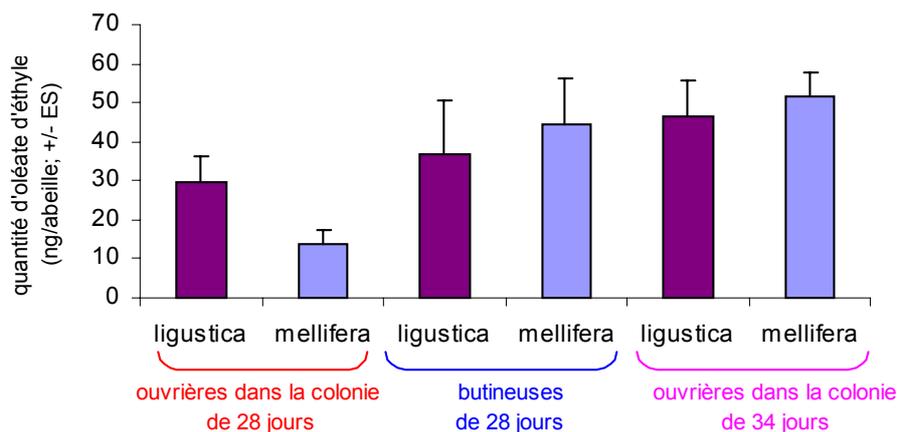


Figure 40 : Comparaison de la quantité de l'oléate d'éthyle dans le jabot de *mellifera* et *ligustica* à 28 et 34 jours.

Seules les ouvrières de 28 jours dans la colonie présentent une différence de quantité d'oléate d'éthyle en fonction de la race. Le jabot des *A. m. ligustica* contient plus d'OE que celui des *A. m. mellifera* (29,3 ng/abeille et 14 ng/abeille en moyenne, respectivement).

En revanche, aucune différence de quantité d'OE dans le jabot ne ressort entre les deux races chez les butineuses de 28 jours ou chez les ouvrières dans la colonie à 34 jours.

Quelle que soit la race, on peut noter une augmentation de la quantité d'OE en fonction de l'âge chez les abeilles prélevées à l'intérieur du nid. Par contre, les proportions d'OE chez les butineuses de 28 jours sont similaires à celles des abeilles plus âgées, de 34 jours.

IV.4.2. Discussion

La comparaison des quantités d'oléate d'éthyle dans le jabot entre les deux races d'*Apis mellifera* L., montre une différence chez les abeilles de 28 jours collectées dans le nid : les *ligustica* possèderaient plus d'OE que les *mellifera*.

Des expériences comportementales ont déjà mis en évidence un pouvoir inhibiteur supérieur des abeilles *ligustica* sur des individus plus jeunes de leur propre espèce (voir partie 2). L'oléate d'éthyle qui semble être plus abondant à 28 jours chez les *ligustica* que chez les *mellifera* pourrait donc être impliqué dans cette inhibition. Cependant, cette différence n'apparaît pas chez les butineuses du même âge ou chez les abeilles de 34 jours. L'inhibition sociale serait peut-être exercée par des ouvrières de 28 jours lorsqu'elles se trouvent à l'intérieur du nid donc au contact avec les abeilles plus jeunes de la colonie. A 34 jours, les abeilles sont déjà très âgées et dans les séries 3 et 4, il nous a été impossible d'en capturer suffisamment pour les analyser. Nous supposons qu'une majorité d'entre elles est morte avant d'atteindre cet âge, la longévité moyenne des ouvrières des régions tempérées dépassant très rarement 30 jours en été (Ribbands, 1953 ; Michener, 1974 ; Guzmánova *et al.*, 1994).

Par conséquent, l'oléate d'éthyle est prédominant dans le jabot des ouvrières âgées de la colonie d'*Apis mellifera ligustica*, et cette molécule pourrait être impliquée dans l'inhibition sociale. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences comportementales pour connaître l'effet biologique de l'oléate d'éthyle sur les ouvrières de la colonie.

V. Effet de l'oléate d'éthyle sur le développement comportemental des ouvrières

L'objectif de cette étude consiste à tester l'effet de l'oléate d'éthyle sur le développement comportemental des ouvrières. L'âge au butinage d'abeilles émergentes est pris comme critère de développement comportemental.

Deux colonies traitées à des doses différentes d'OE sont comparées à un témoin qui ne reçoit aucun traitement. Si l'oléate d'éthyle agit sur le développement comportemental des ouvrières, des différences significatives d'âge au butinage devraient ressortir entre les colonies.

V.1. Matériel et méthodes

V.1.1. Colonies expérimentales

Des colonies à triple cohorte sont utilisées, elles contiennent :

-500 butineuses

-500 nourrices

-500 abeilles âgées d'un jour de vie adulte qui représentent les abeilles étudiées.

Les colonies sont constituées suivant le même protocole que celui décrit dans la partie 5 II.1.

V.1.2. Traitements

Les doses d'oléate d'éthyle ont été calculées d'après les travaux de Le Conte *et al.* (2001). Ces auteurs ont étudié l'effet de la phéromone de couvain sur le développement comportemental des ouvrières émergentes. Cette phéromone est composée de 10 esters d'acides gras (voir partie 1.IV.2.1.) dont les proportions sont connues chez les larves âgées de 4 à 5 jours. L'oléate d'éthyle représente 21% du bouquet phéromonal chez ces larves (Trouiller *et al.*, 1992).

L'oléate d'éthyle est administré chaque jour aux abeilles mélangé à 1 gramme de candi. Ce mode d'administration de la molécule semble être bien adapté, il a été employé dans l'étude précédente sur l'effet des glandes mandibulaires d'ouvrières (voir partie 5 II.1.2.).

Deux doses différentes d'oléate d'éthyle sont testées, elles se distinguent par la concentration plus ou moins forte de la molécule. Les deux doses sont calculées d'après les deux doses de phéromone de couvain administrées aux abeilles dans les mêmes conditions expérimentales (Le Conte *et al.*, 2001). Dans cette étude la plus faible correspond à 1mg de phéromone par gramme de candi. Si on ne tient compte que de l'oléate d'éthyle, la dose correspond à 0.21 mg d'OE par gramme de candi (0.021%). Une butineuse contient en moyenne 60ng d'OE (voir partie 6 II.2.). La faible dose correspond donc à 3500 butineuses équivalents par gramme de candi. Si on considère une consommation égale par tous les membres de la colonie, la faible dose représente 2.3 butineuses équivalents par abeille et par jour. Cette même dose dans l'expérience sur la phéromone larvaire correspondait à 0.41 larve équivalent/abeille/jour.

La dose la plus forte correspond à 10mg de phéromone de couvain par gramme de candi. Pour l'oléate d'éthyle, cela revient à 2.1mg d'OE par gramme de candi, c'est-à-dire 0.21%

de la molécule. Cette forte dose correspond donc à 35000 butineuses équivalents ajoutés par jour ou 23.3 butineuses/abeille/jour.

Chaque série d'expérience comporte trois *nuclei* :

-un *nucleus* traité avec la forte dose d'oléate d'éthyle mélangée à 1 gramme de candi

-un *nucleus* traité avec la faible dose d'oléate d'éthyle mélangée à 1 gramme de candi

-un *nucleus* témoin qui reçoit 1 gramme de candi sans traitement

V.1.3. Mesure du développement comportemental

Le développement comportemental est mesuré en déterminant l'âge au butinage des abeilles de la cohorte d'âge connu (qui ont un jour de vie adulte au début de l'expérience). Les nouvelles butineuses sont dénombrées deux fois par jour et marquées par un point de peinture sur l'abdomen pour ne pas être comptées deux fois (pour plus de détails sur le protocole voir partie 2 II. Et partie 5 II.).

L'âge moyen au butinage des abeilles est calculé à partir des 50 premières butineuses enregistrées (voir partie 3 III.1.3).

Ces expériences réalisées en juin et juillet 2002 regroupent 8 séries.

V.1.4. Analyses statistiques

Le test de Bartlett montre que les variances entre les groupes ne sont pas homogènes, la condition d'hétéroscédasticité n'étant pas respectée, l'analyse de variance sur les données brutes ne peut pas se faire (Fisher et van Belle, 1993 ; Sokal et Rohlf, 1995).

L'effet de l'oléate d'éthyle sur le développement comportemental des ouvrières a donc été analysé par une analyse de variance sur les données transformées : $\log X$. Le test de PPDS de Fisher permet les comparaisons deux à deux au seuil de 5%.

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel StatView®.

V.2. Résultats

Les résultats des huit séries ont été regroupés afin de voir l'effet moyen de l'oléate d'éthyle sur l'âge au butinage des abeilles (figure 41).

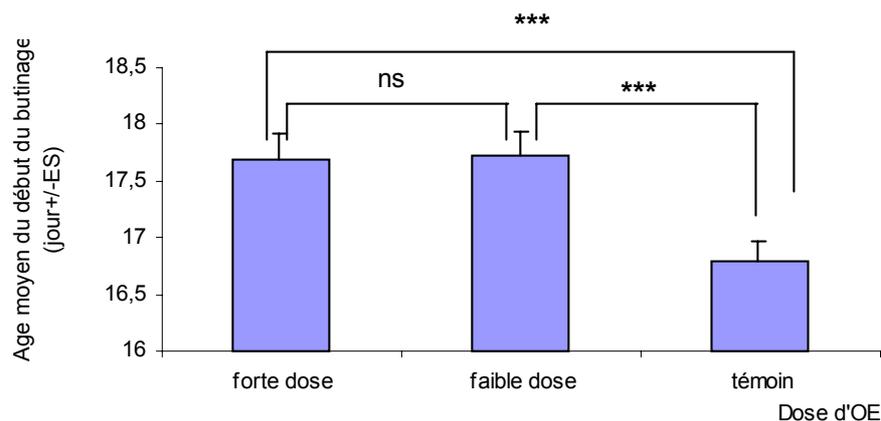


Figure 41 : Effet de l'oléate d'éthyle sur l'âge au butinage.

Résultats moyens pour l'ensemble des séries

*** = $P < 0.001$ (Analyse de variance).

ns = différence non significative.

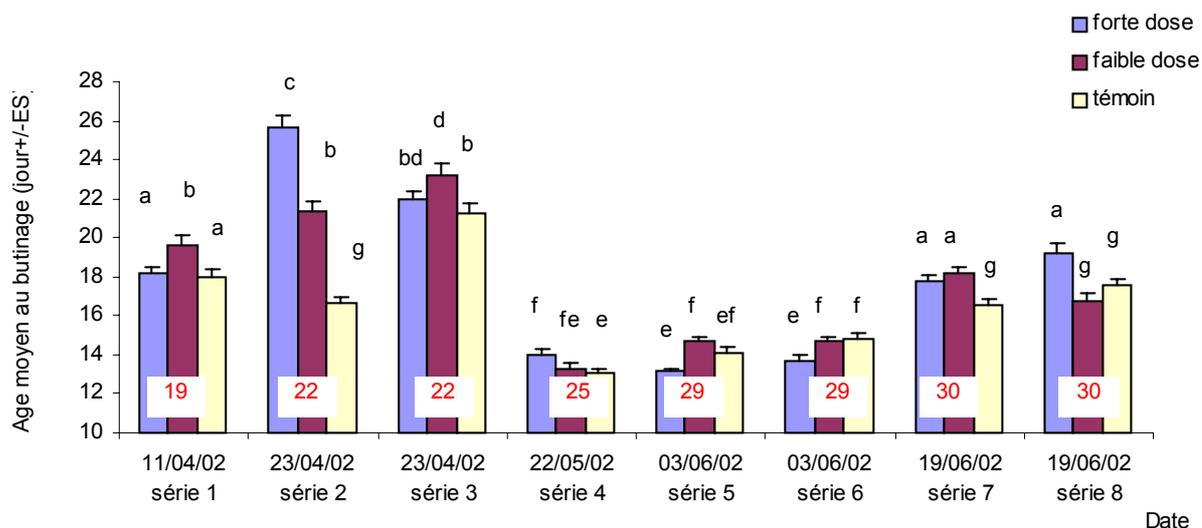


Figure 42 : Effet de l'oléate d'éthyle sur l'âge au butinage des abeilles.

Résultats par série.

Les lettres indiquent des différences statistiques (voir tableau ci-dessous, analyse de variance au seuil de 5%).

Les chiffres rouges représentent les températures moyennes extérieures au cours de l'expérience.

Série	Témoin / forte dose	Témoin / faible dose	Forte dose / faible dose
1	0.5581	0.0061	0.0296
2	<0.0001	<0.0001	<0.0001
3	0.3096	0.0125	0.1335
4	0.0210	0.6470	0.0628
5	0.0033	0.0581	<0.0001
6	0.0029	0.8211	0.0057
7	0.0097	0.0010	0.4527
8	0.0448	0.1585	0.0008

Tableau 16 : Résultats du test de Fisher de comparaisons de chaque traitement 2 à 2 pour chaque série.

En bleu, les différences significatives au seuil de 5 %.

Sur le graphe des résultats globaux des 8 huit séries, on remarque que l'âge moyen du début du butinage est plus faible chez les abeilles non traitées par rapport aux abeilles recevant de l'oléate d'éthyle, quelle que soit la dose. L'analyse de variance révèle qu'il existe bien un effet traitement ($F=11.3$; $P<0.0001$), l'écart d'âge étant d'environ 1 jour.

Si on considère chaque dose, les différences sont significatives entre les abeilles traitées avec la faible dose et les témoins ($P<0.0001$) et les abeilles traitées avec la forte dose et les témoins ($P=0.0003$). En revanche, il n'y a aucun effet dose qui ressort, $P=0.4154$.

Comme il existe également un effet série, ($F=173.3$, $P<0.0001$), les 8 séries sont analysées séparément. Les résultats sont présentés sur la figure 42 et dans le tableau 16. Dans 6 séries sur 8, les abeilles traitées avec de l'oléate d'éthyle en forte dose partent butiner plus tard que les témoins. Cette différence est significative dans 4 cas sur 6. De plus, dans les séries 5 et 6 on observe un effet significatif inverse du traitement, les abeilles recevant la forte dose de OE démarrant leur butinage plus tôt que les témoins. De même, pour la faible dose d'oléate d'éthyle, 6 séries au total indiquent un retard au butinage des abeilles de la colonie traitée par rapport à celles de la colonie témoin et dans 4 séries ce résultat est significativement différent.

On remarque également des différences significatives entre les deux traitements dans 5 séries sur 8 mais aucun effet dose-réponse clair ne ressort.

Il existe aussi un effet significatif de la température sur l'âge au butinage ($F=102.2$, $P<0.0001$). Les âges moyens de butinage sont plus élevés dans les séries où la température moyenne extérieure est la plus faible, 19°C et 22°C (séries 1 à 3). A partir de 25°C , les abeilles butinent plus tôt (série 4). Dans les séries à 30°C (séries 7 et 8), les âges au butinage augmentent mais restent toujours inférieurs à ceux des séries 1 à 3.

V.3. Discussion

Les résultats globaux suggèrent que l'oléate d'éthyle inhibe le butinage précoce des abeilles de la colonie.

Les analyses détaillées par série laissent apparaître des variations dans les effets des traitements. Toutefois, quelle que soit la dose considérée, dans 6 séries sur 8 les colonies traitées montrent un retard au butinage de 1 à 2 jours par rapport aux témoins. Ce retard peut même atteindre 8 jours (série 2) entre la colonie recevant la forte dose d'oléate d'éthyle et les abeilles non traitées.

La forte dose d'oléate d'éthyle agit toujours en ralentissant l'âge au butinage sauf dans deux séries (5 et 6) où l'effet est inversé. De plus, la faible dose qui semble également retarder l'âge au butinage n'agit pas dans ces deux même séries. Ces deux séries ont été réalisées à la même date. Il est donc pensable qu'un événement extérieur à l'expérimentation et non contrôlé ait pu perturber le déroulement de l'expérience. La température extérieure moyenne pour ces deux séries est de 29°C. Dans l'étude sur l'effet des extraits cuticulaires de butineuses sur les jeunes ouvrières, on a supposé que les températures moyennes extérieures supérieures à 30°C pouvaient expliquer les variations de résultats. L'inhibition sociale ne s'observerait plus au delà de cette température, masquée par des changements de l'état général de la colonie (voir partie 5 III.3). Les séries 5 et 6 qui ne révèlent aucun effet inhibiteur des traitements, ont été effectuées à 29°C mais la série qui suit (série 7) indique un retard de l'âge au butinage chez les abeilles traitées par rapport aux témoins, alors que la température extérieure est plus forte, 30°C. Les brusques montées en températures extérieures pourraient peut être venir modifier le comportement normal de la colonie. En effet, la moyenne de température lorsque les abeilles ont entre 1 jour et 10 jours de vie adulte est de 24°C. Les abeilles commencent à partir butiner à partir du onzième jour et la température moyenne de la période de butinage des 50 premières abeilles est de 32°C. Cet écart important de température (8°C) pourrait avoir des conséquences sur l'activité générale de la colonie et ceci pourrait masquer l'effet des traitements sur le développement

comportemental des abeilles. Dans les autres séries, les écarts de température entre la période avant la sortie et la période de butinage des abeilles sont plus faibles, compris entre 2.5 et 3°C.

Si on considère les 6 séries, en écartant les deux séries dans lesquelles les abeilles auraient pu subir un stress hydrique, alors l'effet de la forte dose d'oléate d'éthyle et dans une moindre mesure celui de la faible dose sur le développement comportemental des abeilles est clair. Il n'existe cependant pas d'effet dose, les deux traitements ayant tous deux un effet inhibiteur sur le butinage des abeilles. Les études sur l'effet de la phéromone de couvain indiquent également que la faible dose de la phéromone (correspondant à 0.1% du mélange des 10 esters soit 0.41 équivalent larve par abeille et par jour) provoque un effet plus faible et plus variable sur le développement comportemental des ouvrières que la forte dose (correspondant à 1% du mélange des 10 esters soit 4.1 équivalents larves par abeille et par jour) (Le Conte *et al*, 2001).

Par conséquent, nos résultats montrent que l'oléate d'éthyle est impliqué dans l'inhibition exercée par les butineuses sur les plus jeunes ouvrières de la colonie.

VI. Conclusion de la partie

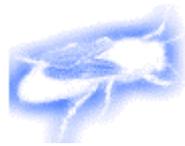
La comparaison des profils chimiques entre nourrices et butineuses a permis d'identifier un ester d'acide gras prépondérant dans l'abdomen des butineuses : l'oléate d'éthyle. Nos résultats ont montré aussi que cette molécule est plus concentrée dans le jabot des ouvrières âgées de 28 jours que dans celui des abeilles âgées d'un jour, 14 ou 22 jours. En revanche, un pic d'oléate d'éthyle apparaît chez les ouvrières de 7 jours. Des deux races d'*Apis mellifera* que nous avons étudiées, *ligustica* et *mellifera*, cette évolution d'oléate d'éthyle dans le jabot de l'abeille en fonction de l'âge ressort uniquement chez *ligustica*. Or des expériences précédentes indiquent que l'inhibition sociale s'exprime clairement chez *ligustica*, les abeilles âgées inhibant le développement comportemental des jeunes ouvrières, alors qu'elle n'est pas observée dans la race *mellifera* (Brillet *et al.*, 2001, voir partie 2). Ces résultats montrent que l'oléate d'éthyle présent chez les *ligustica* âgées pourraient être impliqué dans l'inhibition sociale.

Nos résultats des expériences comportementales viennent renforcer cette conclusion car l'oléate d'éthyle provoque un effet inhibiteur sur le développement comportemental de jeunes ouvrières.

A côté de l'oléate d'éthyle, d'autres esters d'acides gras sont retrouvés chez la nourrice, notamment au niveau du tube digestif. Ces esters, l'oléate de méthyle, le linoléate de méthyle et le palmitate de méthyle, sont des composés de la phéromone larvaire. Certains effets incitateurs et modificateurs de ces molécules ont déjà été mis en évidence (Le Conte *et al.*, 1990 ; 1994 ; 1995 ; Mohammadi *et al.*, 1996 ; 1998). Leur présence dans le tube digestif des nourrices indique des échanges entre les abeilles et le couvain. La transmission de cette phéromone larvaire reste encore inconnue mais elle nécessiterait, tout comme la phéromone de butineuse, des échanges physiques entre les individus, par léchage, contacts antennaires ou trophallaxie. Des études

comportementales et biochimiques de l'équipe d'Y. Le Conte sont en voie de découvrir de nouveaux aspects de la communication chimique chez la larve.

Conclusion générale



Conclusion générale

Notre travail apporte de nouvelles informations sur l'inhibition sociale exercée par les ouvrières âgées sur les jeunes de la colonie d'*Apis mellifera* L.

Tout d'abord, nous avons montré que le signal inhibiteur est chimique et qu'il nécessite des contacts entre ouvrières pour être transmis. Ceci confirme et prolonge les travaux de Huang et Robinson (1996, 1998).

Les comparaisons de profils chimiques entre butineuses et nourrices d'*Apis mellifera ligustica*, indiquent qu'un composé, l'oléate d'éthyle, est prépondérant chez les butineuses et en particulier dans leur jabot.

Plusieurs arguments laissent penser que l'oléate d'éthyle serait impliqué dans l'inhibition sociale. En effet, l'inhibition sociale est exercée par les butineuses sur les plus jeunes ouvrières. Or, nous avons montré que chez *ligustica*, l'évolution de la quantité d'oléate d'éthyle en fonction de l'âge atteint deux pics : le premier, chez les abeilles de 7 jours et le second, supérieur au premier, chez les abeilles les plus âgées (28 jours ou 34 jours). Cette molécule pourrait être le signal inhibiteur transmis des butineuses, qui sont les individus les plus âgés de la colonie, aux ouvrières de 7 jours.

Les études comportementales que nous avons menées pour tester l'effet biologique de l'oléate d'éthyle indiquent que ce composé inhibe le développement comportemental des jeunes ouvrières. Ce résultat vient donc renforcer l'hypothèse de l'implication de cette molécule dans l'inhibition.

De plus, les comparaisons entre les races *Apis mellifera ligustica* et *Apis mellifera mellifera*, fournissent une preuve supplémentaire sur le rôle de l'oléate d'éthyle :

l'expression de l'inhibition sociale apparaît seulement chez *ligustica*, ce qui confirme les travaux de Brillet *et al.* (2001) et cette différence entre les deux races se retrouve aussi lorsque l'on compare les quantités d'oléate d'éthyle : l'évolution de la quantité de la molécule dans le jabot des ouvrières en fonction de l'âge et sa prépondérance chez les butineuses ont été mis en évidence seulement chez la race *A. m. ligustica*. Ainsi le l'oléate d'éthyle pourrait bien être impliqué dans l'inhibition exercée par les butineuses chez *A. m. ligustica*.

L'évolution de la quantité d'oléate d'éthyle au cours du temps dans le jabot est similaire à celle de l'hormone juvénile (HJ) dont le taux augmente dans l'hémolymphe en fonction de l'âge. Or la HJ est connue pour activer le développement comportemental. Il serait intéressant d'analyser si l'oléate d'éthyle agit sur le taux de HJ et inversement pour savoir comment ces deux systèmes interviennent dans le développement de l'ouvrière. L'ancien modèle de Huang et Robinson suppose que l'activateur du développement comportemental, la HJ serait couplé à un inhibiteur non identifié de telle sorte que la butineuse âgée qui possède une forte quantité de HJ serait également fortement inhibitrice. Ce modèle a été remplacé par celui de l'inhibition sociale (Beshers et Fewell, 2001) qui ne prend en compte que l'inhibiteur, la HJ n'étant pas indispensable à la régulation du développement comportemental (Sullivan *et al.*, 2000), ne serait pas le seul activateur. Il n'en demeure pas moins que l'inhibiteur, reste toujours d'actualité, et pourrait agir sur l'hormone juvénile. Différents arguments laissent envisager l'hypothèse de l'action de l'oléate d'éthyle sur l'hormone juvénile (HJ). Tout d'abord, la phéromone de couvain diminue le taux d'HJ chez les abeilles et inhibe leur développement comportemental (Le Conte *et al.*, 2001). De plus, une faible quantité d'HJ dans l'hémolymphe de l'ouvrière est associée à un état développé des glandes hypopharyngiennes (Huang *et al.*, 1994). Or l'oléate d'éthyle, qui fait partie des 10 esters d'acides gras de la phéromone de couvain, inhibe le développement comportemental des ouvrières et stimule la synthèse protéique des glandes hypopharyngiennes (Mohammedi *et al.*, 1996). Donc cette molécule pourrait agir sur le taux d'hormone juvénile.

1. Hypothèse sur la transmission de la phéromone

Pour confirmer l'implication de l'oléate d'éthyle dans l'inhibition sociale, il manque une étape clé : connaître la transmission de la molécule des butineuses vers les jeunes ouvrières.

Ce signal inhibiteur, qui impliquerait l'oléate d'éthyle, passe des abeilles âgées aux jeunes ouvrières par contacts physiques.

L'oléate d'éthyle étant présent au niveau du tube digestif et notamment dans le jabot, une hypothèse consiste à penser que la molécule est véhiculée par trophallaxie. Divers travaux ont déjà démontré le rôle de la trophallaxie dans l'échange d'informations dans la colonie (Park, 1923 ; Rösch, 1925 ; Nixon ; Ribbands, 1952 ; Free, 1965 ; Wilson, 1971, Korst et Velthuis 1985). Butler (1954) suppose que les phéromones de reine pourraient être véhiculées entre les ouvrières par trophallaxie. Dans la colonie, les échanges trophallactiques entre jeunes ouvrières et butineuses ne paraissent pas fréquents : plus l'ouvrière est âgée, moins elle nourrit les jeunes abeilles par trophallaxie (Moritz et Hallmen, 1986 ; Lass et Crailsheim, 1996). D'autres études ont montré que, dans des conditions de laboratoire, les nourrices de 7 jours, en présence d'abeilles émergentes, assurent le développement des plus jeunes en les nourrissant par trophallaxie. Par contre, des butineuses âgées placées avec des abeilles émergentes ne remplissent pas ce rôle (Naiem *et al.*, 1999) même si dans de rares cas, les butineuses peuvent régresser au stade de nourrice (Rösch, 1930). Il semblerait donc que les abeilles émergentes rentrent plus souvent en contact avec les ouvrières d'âge intermédiaire qu'avec les individus les plus âgés de la colonie. Ceci est confirmé par le fait que les butineuses interagissent principalement avec les « déchargeuses », ouvrières d'âge intermédiaire qui réceptionnent le nectar, par qui elles obtiennent des informations sur les besoins de la colonie et le type de provisions nécessaires (Seeley, 1989). L'inhibition sociale exercée par les butineuses pourrait donc passer par les abeilles déchargeuses avant d'atteindre les plus jeunes ouvrières. L'oléate d'éthyle pourrait-il être transmis des butineuses aux déchargeuses ? Si on considère l'oléate d'éthyle comme l'inhibiteur, les deux pics dans le jabot des abeilles de 7 et 28 jours indiquent que l'inhibiteur serait présent à ces deux stades. Le scénario serait alors que les abeilles de 28 jours qui sont le plus souvent des butineuses

inhiberaient les abeilles de 7 jours qui seraient des nourrices ou des déchargeuses. L'âge de ces dernières est en moyenne de 12 jours, elles seraient donc plus âgées que les nourrices, dont l'âge moyen est de 7 jours (Winston, 1987). Cependant, ces âges sont à prendre avec prudence car comme nous l'avons précisé dans la première partie de ce manuscrit, il existe une grande variabilité des âges auxquels les ouvrières exécutent les tâches domestiques. Dans la littérature l'âge auquel l'ouvrière décharge le nectar peut varier de 1 jour (Kolmes, 1985a, b) à 22 jours (Seeley, 1982), selon les auteurs et les conditions expérimentales. Ainsi nous n'écartons pas l'hypothèse que le pic d'oléate d'éthyle à 7 jours pourrait être causé par les interactions entre butineuses et déchargeuses. Les contacts entre les butineuses et les nourrices sont possibles car les butineuses patrouillent fréquemment dans la colonie. Ces abeilles de 7 jours pourraient également être des nourrices et avoir été en contact avec les butineuses. Selon notre hypothèse, le signal inhibiteur serait donc transmis des ouvrières les plus vieilles de la colonie vers les abeilles de 7 jours, les empêchant de se développer précocement.

On peut supposer que le signal inhibiteur est transféré par des contacts cuticulaires entre les ouvrières (par léchage, par contacts antennaires, par frottements ou par d'autres contacts cuticulaires). Nous avons montré que les extraits cuticulaires de butineuses semblent être actifs dans l'inhibition des jeunes ouvrières. Un résultat préliminaire (qui n'est pas présenté ici) a révélé une très faible quantité d'oléate d'éthyle sur la cuticule des butineuses. L'oléate d'éthyle présent dans le jabot pourrait être transporté vers la cuticule, où il serait transmis aux jeunes ouvrières. Des lipophorines pourraient servir à ce transport car de nombreux travaux ont montré le rôle de transport des lipophorines chez les animaux. Par exemple, chez *Manduca sexta*, les lipophorines permettent le transport des lipides depuis l'intestin jusqu'au corps gras ou celui des lipides du corps gras vers les muscles alaires (Soulages et Wells, 1994). Chez *Blattella germanica*, des lipophorines ont été aussi mises en évidence dans l'acheminement de la phéromone sexuelle de contact, « methyl ketone contact sex pheromone », depuis les oenocytes vers les tissus internes et vers l'épicuticule (Gu *et al.*, 1995). De même chez *Musca domestica*, ces molécules permettent le transport des hydrocarbures et de la phéromone sexuelle (Schal *et al.*, 2001). Chez l'homme, les esters éthyliques d'acides gras

représentent les produits non oxydés du métabolisme de l'éthanol. Ils causeraient dans l'organisme des troubles pathologiques au niveau de certains organes ou de tissus. Dans le sang, ils seraient véhiculés par des lipoprotéines et par l'albumine (Bird *et al.*, 1997).

Même si la transmission de l'inhibiteur n'est pas encore connue, nous savons que l'échange se fait pas interaction de contact entre les ouvrières. Chez d'autres insectes sociaux l'importance des interactions sociales dans la régulation de développement des individus a été également rapportée. Chez *Lasius niger*, en l'absence de vieilles ouvrières, un certain nombre d'individus devient d'emblée pourvoyeuses, moins efficaces que des pourvoyeuses âgées mais assurant tout de même l'approvisionnement de la colonie (Lenoir, 1979). Chez *Pheidole pubiventris*, les majors commencent à s'occuper des larves lorsque les minors, qui prennent soins des immatures dans des conditions normales, aient été supprimés de la colonie. Les majors percevraient les stimuli incitant aux soins aux larves uniquement en l'absence de toute interaction avec les minors (Wilson, 1984).

Pour tenter de suivre l'oléate d'éthyle dans l'organisme de l'abeille, connaître son lieu de sécrétion, son mode de transmission aux autres ouvrières de la colonie, nous envisageons de réaliser des expériences utilisant des précurseurs radioactifs de la molécule. Des études similaires sur la phéromone des glandes mandibulaires de reine (PGMR) ont permis d'obtenir des informations sur la production, la sécrétion et la transmission de la PGMR dans la colonie. La phéromone de synthèse renferme du 9-ODA radioactif, le composé majoritaire de la PGMR. Le transfert de la molécule radioactive a été suivi à l'intérieur de la colonie. La PGMR est en premier transmise aux ouvrières « messagères » qui lèchent le corps de la reine ou rentrent en contacts antennaires avec elle. Ces dernières vont disperser le message chimique aux autres ouvrières de la colonie. La phéromone est également déposée par la reine sur la cire puis reprise par d'autres ouvrières. Toutefois, pour des raisons encore inconnues, une partie importante de la PGMR est métabolisée par la reine elle-même et par les « messagères » (Naumann *et al.*, 1991).

2. Hypothèses sur l'origine de l'oléate d'éthyle

Quelle est l'origine de l'oléate d'éthyle concentré dans le jabot des ouvrières âgées ?

Cette molécule pourrait être exogène à l'abeille et provenir du nectar ou du pollen. Cependant, aucune trace d'oléate d'éthyle n'a été détectée dans le nectar régurgité par les butineuses. En revanche, les pelotes de pollen contiennent de l'oléate d'éthyle. Toutefois, il semble peu probable que l'oléate d'éthyle contenu dans le jabot des butineuses provient du pollen des fleurs car de nombreux travaux ont montré que les butineuses ne consomment pas de pollen (Lindauer, 1952 ; Crailsheim *et al.*, 1992 ; Hrassnigg et Crailsheim, 1998). Le pollen est nécessaire aux abeilles au stade adulte juste après leur émergence pour la formation de leurs tissus puis au cours de leur vie, les ouvrières en consomment de moins en moins (Lindauer, 1952 ; Morton, 1951 ; Hagedorn et Moeller, 1967 ; Dietz, 1969 ; Haydak, 1970).

Le pollen contient moins de 5% de lipides (dans Winston, 1987) mais la composition chimique du pollen varie en fonction de la plante (Schmidt, 1984). Afin de connaître l'origine de l'oléate d'éthyle, nous envisageons de quantifier, par chromatographie en phase gazeuse, l'oléate d'éthyle dans du pollen prélevé directement sur les fleurs. Si le pollen n'en contient pas, l'oléate d'éthyle peut être alors endogène à l'abeille.

Si la molécule est produite par l'abeille elle-même, elle pourrait être contenue dans la sécrétion que la butineuse dépose sur le pollen lors de la formation des pelotes ce qui expliquerait sa présence dans les extraits de pelotes de pollen. La comparaison des profils d'oléate d'éthyle entre pollen de fleurs et pelotes de pollen permettra de répondre à cette question.

3. L'oléate d'éthyle, une molécule ubiquiste

La découverte de l'oléate d'éthyle comme composé de l'inhibition exercée par les butineuses, vient compléter d'autres études sur l'action de cette molécule. Elle fait partie du bouquet phéromonal larvaire, qui est une phéromone ayant des effets à la fois incitateurs et modificateurs sur les ouvrières de la colonie.

L'oléate d'éthyle a aussi été identifié chez la reine dans des quantités importantes (Keeling, 2001), une reine fécondée en contient 100 fois plus que la butineuse et on en retrouve deux fois plus dans les extraits d'abdomen que dans les extraits de tête ou de thorax. Même si les glandes mandibulaires de reine renferment de l'oléate d'éthyle, ce composé ne semble pas jouer un rôle dans le comportement de cour.

Les glandes mandibulaires de reine sécrètent en outre un bouquet phéromonal qui possède de multiples effets incitateurs et modificateurs sur les membres de la colonie (voir partie 1 IV.2.1). Comme la phéromone larvaire ou celle des butineuses, cette phéromone inhibe également le développement comportemental des ouvrières (Pankiw *et al.*, 1998).

Si l'oléate d'éthyle est le signal inhibiteur, il pourrait être transmis dans la colonie de la façon suivante (voir figure 43) : les butineuses possédant une forte quantité d'oléate d'éthyle le transmettraient aux déchargeuses ou autres ouvrières du nid, qui recevraient alors l'inhibiteur à l'âge de 7 jours. Toutefois, l'oléate d'éthyle présent chez les ouvrières de 7 jours pourrait également provenir du couvain qui sécrète sur sa cuticule un mélange phéromonal de 10 esters dont l'oléate d'éthyle. Des expériences visant à caractériser la glande productrice de ce bouquet phéromonal chez la larve sont en cours au laboratoire de Protection et Biologie de l'Abeille à l'INRA d'Avignon (Y. Le Conte). Cette phéromone inhibe le développement comportemental des ouvrières et l'oléate d'éthyle associé au palmitate de méthyle possède un autre effet modificateur : il stimule la synthèse protéique des glandes hypopharyngiennes des nourrices (Mohammedi *et al.*, 1996). La reine renferme également de l'oléate d'éthyle qui pourrait provoquer ce même effet stimulateur sur les glandes hypopharyngiennes des nourrices, car ces glandes produisent la gelée royale qui alimente la reine (voir figure 43).

Ainsi, ces différents signaux émanant des divers membres de la colonie permettraient que l'équilibre social soit atteint dans la colonie, chacun exécutant la bonne tâche au bon moment.



Figure 43 : Schéma hypothétique de la transmission de l'oléate d'éthyle par les butineuses, les larves et la reine aux ouvrières du nid.

OE=oléate d'éthyle, PC=phéromone de couvain, PGMR=phéromone des glandes mandibulaires de reine, GHP=glandes hypopharyngiennes.

Photos Yves Le Conte, INRA.

L'oléate d'éthyle est également présent chez d'autres insectes mais son rôle n'a pas encore été démontré. Par exemple, chez l'abeille solitaire, *Megachile rotundata*, l'oléate d'éthyle et le stéarate d'éthyle représentent à eux deux en moyenne 1.5% de la sécrétion des glandes de Dufour chez les jeunes femelles et 3% chez les femelles âgées. Ils sont retrouvés sous forme de trace sur la cuticule de mâles et de femelles (Paulmier, 1994).

Chez les bourdons, les composés principaux des glandes labiales de mâles sont des alcools et des acétates. Cependant, des différences de composition chimique existent entre les genres et certaines espèces du genre *Bombus* possèdent spécifiquement des esters d'acides gras dont l'oléate d'éthyle. Ces glandes labiales sécrètent des phéromones de marquage qui attirent les femelles vers le lieu de copulation. Les divergences phéromonales permettent l'isolement spécifique pré-copulatoire et empêchent l'hybridation (Bergström *et al.*, 1981).

Chez deux races d'*Apis mellifera*, (*capensis* et *scutellata*), les glandes tergales des reines et des ouvrières contiennent en majorité l'acide Z-9- octodécénoïque (Wossler et crewe, 1999). Chez ces races, les glandes tergales sont développées chez les ouvrières (Billen *et al.*, 1986). Les sécrétions tergales permettraient la reconnaissance des différentes castes.

4. Difficulté à identifier des phéromones : l'exemple de la « substance royale »

La richesse du langage chimique chez l'abeille laisse supposer que l'oléate d'éthyle ne serait pas le seul composé impliqué dans l'inhibition sociale.

Les phéromones des insectes sociaux apparaissent en effet comme des mélanges chimiques complexes. Chaque molécule d'un bouquet phéromonal peut induire des effets isolés sur l'organisme ou avoir une action additive ou synergique avec d'autres phéromones (Hölldobler, 1995).

L'histoire de la « substance royale » témoigne bien de la complexité à identifier une phéromone. Les glandes mandibulaires de la reine provoque une forte attraction des ouvrières, son composé majoritaire, le 9-ODA a été identifié en 1960 par deux équipes séparément, celle de Barbier et Lederer (1960) et celle de Callow et Johnston (1960). Cependant, le rôle biologique de cette molécule sur les ouvrières n'a pas été clairement démontré jusqu'en 1988.

Pour connaître l'effet d'une molécule chimique sur les membres de la colonie, il est nécessaire de mettre en point un test biologique fiable. Plusieurs tests ont vu le jour, basés notamment sur le rôle des glandes mandibulaires de reine dans l'attraction des mâles ou dans la stabilisation de l'essaim. Grâce à ces techniques, des substances

découvertes dans les glandes mandibulaires de reine se sont révélées être des métabolites ou des précurseurs du 9-ODA et n'avaient aucun effet biologique sur les abeilles.

Simpson (1979) a mis en place un test biologique en plaçant au-dessus d'une colonie ouverte du papier filtre sur lequel les substances à tester ont été préalablement adsorbées. Après une période d'exposition, il dénombre les abeilles qui se sont regroupées sur le papier. Ce test montre des résultats clairs sur l'effet des glandes mandibulaires cependant il nécessite de nombreuses colonies et ne constitue pas un outil facile pour l'isolation et l'identification des molécules.

Barbier et Pain (1960) utilisent des cagettes contenant des abeilles et y ajoutent un beurre de reine imprégné de substances à tester. Le résultat est surprenant : les abeilles sont attirées par l'extrait des glandes mandibulaires mais pas par le 9-ODA seul...

Des fractions d'extraits de glandes mandibulaires de reine ont été ensuite isolément analysées par un test biologique sur le comportement de cour des ouvrières (Kaminski *et al.*, 1990). Les fractions sont moins actives sur le comportement de cour que l'extrait total. Ces chercheurs démontrent l'effet synergique des molécules du bouquet phéromonal, l'action commune des molécules dépassant la somme des réponses de chaque composé. Ce mélange est constitué de 5 composés qui agissent donc en synergie, le 9-ODA (R) et (S), 9-HDA, HOB et HVA (voir partie 1 IV.2.1.). Ces molécules ont été quantifiées en fonction de l'âge de la reine et de multiples rôles incitateurs et modificateurs de la phéromone ont été démontrés.

Récemment, deux lignées d'*Apis mellifera* L., différentes dans leur réponse par le comportement de cour, ont été mise en évidence (Pankiw *et al.*, 2000). Alors que les abeilles d'une lignée sont très sensibles à la PGMR de synthèse (composées des 5 molécules), celles de l'autre lignée sont peu sensibles. L'étude comparative entre l'effet de la PGMR de synthèse et l'effet d'extraits de glandes mandibulaires de reine chez la lignée peu sensible à la PGMR a permis de découvrir 4 nouveaux composés de la phéromone de la PGMR : l'oléate de méthyle, l'alcool coniferyl, le 1-hexadécanol et l'acide linoléique. Ces quatre substances sont actives sur le comportement de cour des abeilles quand elles sont combinées aux autres composés de la phéromone.

L'exemple de la phéromone des glandes mandibulaires de la reine souligne l'importance de la synergie entre les composants du bouquet phéromonal ; mais la synergie peut également se produire entre des molécules provenant de différentes phéromones. Par exemple, la PGMR, la phéromone de couvain et l'éventuelle phéromone de butineuses pourraient avoir une action synergique car séparément, chacune inhibe le développement comportemental des ouvrières. Des recherches sur la synergie de ces trois phéromones sont en cours au laboratoire de Protection et Biologie de l'Abeille (Y. Le Conte, Inra).

Un autre exemple de complexité du langage chimique utilisé *Apis mellifera* L. se situe à l'échelle de la molécule.

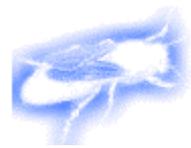
Une même molécule peut provenir de différents individus de la société et agir sur une cible commune. C'est le cas de l'oléate d'éthyle qui est sécrété par des individus aussi différents que les larves et probablement les ouvrières âgées et qui pourtant provoquerait le même effet inhibiteur sur le développement des ouvrières.

A l'opposé, une même substance chimique peut avoir des effets différents dans la colonie. Par exemple, l'oléate de méthyle a été détecté dans la phéromone de couvain (Le Conte *et al.*, 1990) et dans la phéromone de la glande mandibulaire de la reine (Keeling, 2001). Chez la reine cette substance incite le comportement de cour des ouvrières (Keeling, 2001) alors que chez la larve, elle augmente l'acceptation des cellules de reine par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1995) et incite le comportement d'operculation des cellules de couvain (Le Conte *et al.*, 1990).

« Le langage chimique des insectes sociaux possèdent des mots que nous pouvons identifier mais la syntaxe d'un tel langage reste encore difficile à décoder »(Slessor).

Nos résultats confirment le modèle de « l'inhibition sociale » et démontrent que l'oléate d'éthyle ferait partie du signal chimique inhibiteur émis par les butineuses. Il s'agirait alors de la première phéromone modificatrice de butineuses identifiée chez *Apis mellifera* L. Chez cette espèce deux phéromones modificatrices sont déjà connues, la phéromone des glandes mandibulaires de la reine (Pankiw *et al.*, 1998) et la phéromone de couvain (Le Conte *et al.*, 2001).

Bibliographie



Bibliographie

ALLEN, M.D., 1959a. The occurrence and possible significance of the "shaking" of honeybee queens by the workers. *Anim Behav* 7, 66-69.

ALLEN, M.D., 1959b. The "shaking" of worker honeybees by other workers. *Anim Behav* 7, 233-240.

ARNOLD, G. et DELAGE-DARCHEN, B., 1978. Nouvelles données sur l'équipement enzymatique des glandes salivaires de l'ouvrière d'*Apis mellifera* (Hyménoptère Apidae). *Annales des Sciences Naturelles, Zool Biol Anim* 20, 401-422.

BARBIER, J. et LEDERER, E., 1960. Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifera* L.). *C. r. Séances Acad Sci* 251, 1131-1135..

BARBIER, M. et PAIN, J., 1960. Study of the secretion of queen and worker mandibular glands (*Apis mellifera*) by gas-phase chromatography. *C. r. Séances Acad Sci* 250, 3740-3742.

BEETSMA, J. et TEN HOUTEN, A., 1974. Effects of juvenile hormone analogues in the food of honeybee colonies. *Z angew Entomol* 77, 292-300.

BEN-SHAHAR, Y, ROBICHON, A., SOKOLOWSKI, M.B. et ROBINSON, G.E. 2002. Influence of gene action across different time scales on behavior. *Science* 296, 741-744

BERGSTRÖM, G., SVENSSON, B.G., APELGREN, M. et GROTH, I., 1981. Complexity of bumble bee marking pheromones: Biochemical, ecological and systematical

interpretations. In: *Biosystematics of Social Insects*. Academic Press, London. Howse, P.E. et Clément, J.L., Eds. 175-183 p.

BESHERS, S.N. et FEWELL, J.H., 2001. Models of Division of Labor in Social Insects. *Annu Rev Entomol* 46, 413-440.

BILLEN, J.P.J., DUMORTIER, K.T.M. et VELTHUIS, H.H.W., 1986. Plasticity of honeybee castes: occurrence of tergal glands in workers. *Naturwiss* 73, 332-333.

BIRD, D.A., KABAKIBI, A. et LAPOSATA, M., 1997. The distribution of fatty acid ethyl esters among lipoproteins and albumin in human serum. *Alcohol Clin Exp Res* 21, 602-605.

BREED, M.D., ROBINSON, G.E. et PAGE, R.E., 1990. Division of labor during honey bee colony defense. *Behav Ecol Sociobiol* 27, 395-401.

BRILLET, C., ROBINSON, G.E., BUES, R. et LE CONTE, Y., 2002. Racial differences in Division of labor in Colonies of the Honey Bee (*Apis mellifera*). *Ethology* 108, 115-126.

BURDA, H. and KAWALIKA, M., 1993. Evolution of eusociality in the Bathyergidae. The case of the giant mole rats . *Naturwiss* 80: 235-7.

BUTENANDT, A. et REMBOLD, H., 1957. Über den weiselzellenfutter-saft der honigbiene I. Isolierung, konsitutionsermittlung and vorkommen der 10-hydroxy-2-decensäure. *Hopp-seyl Z* 308, 284-289.

BUTLER, C., 1609. *The feminine monarchie*. Oxford, Joseph Barnes.

BUTLER, C.G., 1954; The importance of "queen substance" in the life of a honeybee colony. *Bee World* 35, 169-176.

BUTLER, C.G., 1966. Mandibular gland pheromone of worker honeybees. *Nature, Lond* 212, 530.

BUTLER, C.G. et FAIREY, E.M., 1964. Pheromones of the honeybee: biological studies of the mandibular secretion of the queen. *J Apic Res* 3, 65-76.

CALDERONE, N.W et PAGE, R.E., 1988. Genotypic variability in age polyethism and task specialisation in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behav Ecol Sociobiol* 22, 17-25.

CALDERONE, N.W., ROBINSON, G.E. et PAGE, R.E., 1989. Genetic structure and division of labour in the honey bee society. *Experientia* 45, 765-767.

CALDERONE, N.W et PAGE, R.E., 1992. Effects of interactions among genotypically diverse nestmates on task specialization by foraging honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Behav Ecol Sociobiol* 22, 17-25.

CALLOW, R.K. et JOHNSTON, N.C., 1960. The chemical constitution and synthesis of queen substances of honeybees, (*Apis mellifera* L.). *Bee World* 41, 152-153.

CALLOW, R.K., CHAPMAN, J.R. et PATON, P.N., 1964. Pheromones of the honey bee: Chemical studies of the mandibular gland secretion of the queen. *J Apic Res* 3, 77-89.

CHADWICK, P.C., 1931. Ventilation of the hive. *Glean Bee Cult* 59, 356-358.

CHESEL, D. et MERCIER, P., 1993. Couplage de triplets statistiques et liaisons espèces-environnement. Biométrie et environnement. J.D. Lebreton et B. Asselin (Eds), Masson, Paris, pp 15-43.

COLLETT, D., 1991. Modelling binary data. Chapman et Hall, London, 369p.

COLLINS, A.M., RINDERER, T.E., TUCKER K.W., SYLVESTER, H.A. et LACKETT, J.J., 1980. A model of honeybee defensive behaviour. *J Apic Res* 19, 224-231.

CORNUET, J.M., 1983. Reproduction, génétique et sélection de l'Abeille. *Bull tech apic* 10, 13-36.

CRAILSHEIM, K. et STOLBERG, E., 1989. Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 35, 595-602.

CRAILSHEIM, K., SCHNEIDER, L.H.W., HRASSNIGG, N., BÜHLMANN, G., BROSCH, U., GMEINBAUER, R et SCHÖFFMANN, B., 1992. Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): dependence on individual age and function. *J. Insect Physiol* 38, 409-419.

CRAILSHEIM, K., RIESSBERGER, U., BLASCHON, B., NOWOGRODZKI, R. et HRASSNIGG, N., 1999. Short-term effects of stimulated bad weather conditions upon the behaviour of food-storer honeybees during day and night (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie* 30, 299-310.

CRESPI, B.J., 1992. Eusociality in Australian gall thrips. *Nature* 359, 724-726.

DENEUBOURG, J.L., GROSS, S., PASTEELS, J.M., FRESNEAU, D. et LACHAUD, J.P., 1987. Self-organization mechanisms in ant societies II. Learning in foraging and division of labour. *Exp Suppl* 54, 177-196.

DIETZ, A., 1969. Initiation of pollen consumption and pollen movement through the alimentary canal of newly emerged honey bees. *Ann Entomol Soc Am* 62, 43-46.

DONHOFF, E., 1855a. Ueber das Geruchsorgan der Biene. In *Beiträge zur Biennkunde*. Berlin, Pfenningstorff.

DONHOFF, E., 1855b. Ueber das herrschen verschiedener triede in verschieden lebensattem bei den Bienen. In *Beiträge zur Biennkunde*. Berlin, Pfenningstorff.

DREYLING, L., 1903. Ueber die wachsbereitenden Organe der Honigbiene. *Zool Anz* 26, 710-715.

DURST, C., EICHMULLER, S. et MENZEL, R., 1994. Development and experience lead to increased volume of subcompartments of the honeybee mushroom body. *Behav Neural Biol* 62, 259-263.

FAHRBACH, S.E. et ROBINSON, G.E., 1996. Juvenile hormone, behavioral maturation and brain structure in the honey bee. *Dev neurosci* 18, 102-114.

FERGUSON, L.A. et WINSTON, M.L., 1987. The influence of wax deprivation on temporal polyethism in honey bee colonies. *Can J Zool* 66, 1997-2001.

FISHER, L.D. et VAN BELLE G., 1993. Biostatistics: a Methodology for the Health Sciences. John Wilet and Sons, INC. New York. 991 p.

FLURI, P., LUSCHER, M., WILLE, H. et GERIG, L., 1982. Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *J Insect Physiol* 28, 61-68.

FRANCIS, G. W., 1981. Alkylthiolation for the determination of double bond position in unsaturated fatty acid esters. *Chem Phys Lipids* 29, 369-374.

FREE, J.B., 1955. The division of labour within bumblebee colonies. *Ins Soc* 2, 195-212.

FREE, J.B., 1957. The transmission of food between worker honeybees. *Anim Behav* 5, 41-47.

FREE, J.B., 1965. The allocation of duties among workers honeybees. *Symp Zool Soc London* 14, 39-59.

FREE, J.B., 1979. Managing honeybee colonies to enhance the pollen-gathering stimulus from brood pheromones. *Appl Anim Ethol* 5, 173-178.

FRISCH, K., VON. 1952. Vie et moeurs des abeilles. Paris, Albin Michel, Ed. 220 p. (en all.).

FRISCH, K., VON. 1967. [The dance language and orientation of bees.] Cambridge, MA: The Belnap Press of Harvard University Press. 578 p. (en all.).

GIRAY, T. et ROBINSON, G.E., 1994. Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 35, 13-20.

GIRAY, T. et ROBINSON, G.E., 1996. Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93, 11718-11722.

GIRAY, T., HUANG, Z.Y., GUZMAN-NOVOA, E. et ROBINSON, G.E., 1999. Physiological correlates of genetic variation for rate of behavioral development in the honeybee, *Apis mellifera* L. *Behav Ecol Sociobiol* 47, 17-28.

GIRAY, T., GUZMAN-NOVOA, E., ARON, E., ZELINSKY, C., FAHRBACH, S.E. et ROBINSON, G.E., 2000. Genetic variation in temporal polyethism and colony defensiveness in the honey bee, *Apis mellifera*. *Behav Ecol* 11, 44-55.

GOETZE, G., 1940. Die beste Biene. Liedloff, Loth und michaelis, Leipzig.

GU, X., QUILICI, D., JUAREZ, P., BLOMQUIST, G.J. et SCHAL, C., 1995. Biosynthesis of Hydrocarbons and Contact-Sex Pheromone and their Transport by Lipophorin in Females of the German Cockroach (*Blattella germanica*). *J Insect Physiol* 41, 257-267.

GUZMANNNOVA, E., PAGE, R.E. et GARY, N.E., 1994. Behavioral and life history components of division of labor in honey bees. *Behav Ecol Sociobiol* 34, 409-417.

HAGEDORN, H.H. et MOELLER, F.E., 1967. The rate of pollen consumption by newly emerged honeybees. *J Apic Res* 6, 159-162.

HARTFELDER, K., 2000. Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Braz J Med Res* 33, 157-177.

HAYDAK, M.H., 1959. Changes with age in weight and nitrogen content of honeybees. *Bee World* 40, 225-229.

HAYDAK, M.H., 1970. Honey bee nutrition. *Ann Rev Entomol* 15, 143-156.

HRASSNIGG, N. et CRAILSHEIM, K, 1998. The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 44, 393-404.

HIGO, H.A., COLLEY, S.J., WINSTON, M.L. et SLESSOR, K.N., 1992. Effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) Queen mandibular gland pheromone and brood rearing. *Can Entomol* 124, 409-418.

HIMMER, A., 1930. Von der Arbeitsteilung im bienenstaat. *Leipzig Bienenztg.* 45, 39-43, 64-67.

HÖLLDOBLER, B., 1995. The chemistry of social regulation: Multicomponent signals in ant societies. *Proc Natl Acad Sci* 92, 19-22.

HÖLLDOBLER, B. et WILSON, E.O., 1990. The Ants. The Belknap Press of the Harvard University Press, Cambridge, MA. 732 p.

HUANG, Z.Y., OTIS, G.W. et TEAL, P.E.A., 1989. Nature of brood signal activating the protein synthesis of hypopharyngeal glands in the honey bee, *Apis mellifera* (Apidae: Hymenoptera). *Apidologie* 20, 455-464.

HUANG, Z.Y., ROBINSON, G.E., TOBE, S.T., YAGI, K.J., STRAMBI, C., STRAMBI, A. et STAY, B., 1991. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J Insect Physiol* 37, 733-741.

HUANG, Z.Y. et ROBINSON, G.E., 1992. Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labour. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89, 11726-11729.

HUANG, Z.Y., ROBINSON, G.E. et BORST, D.W., 1994. Physiological correlates of division of labor among similarly aged honey bees; *J Comp Physiol A* 174, 731-739.

HUANG, Z.Y. et ROBINSON, G.E., 1995. Seasonal changes in juvenile hormone titers and rates of biosynthesis in honey bees. *J Comp Physiol B* 165, 18-28.

HUANG, Z.Y. et ROBINSON, G.E., 1996. Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behav Ecol Sociobiol* 39, 147-158.

HUANG, Z.Y., PLETTNER, E. et ROBINSON, G.E., 1998. Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine-mediated behavioral development in honey bees. *J Comp Physiol A* 183, 143-152.

HUNNICUTT, D., TOONG, Y.C. et BORST, D.W., 1989. A chiral specific antiserum for juvenile hormone. *Am Zool* 29, 48.

ITÔ, Y., 1989. The Evolutionary Biology of Sterile Soldiers in Aphids. *TREE* 4, 69-73.

JAY, S.C., 1970. The effect of various combinations of immature queen and worker bees on the ovary development of worker honeybees in colonies with or without queens. *Can J Zool* 48, 169-173.

JAYCOX, E.R., SKOWRONEK, W. et GWYNN, G., 1974. Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera*) induced by injections of a juvenile hormone mimic. *Ann Entomol Soc Am* 67, 529-534.

JAYCOX, E.R., 1976. Behavioral changes in worker honey bees (*Apis mellifera* L.) after injection with synthetic juvenile hormone (Hymenoptera: Apidae). *J Kansas Entomol Soc* 49, 165-170.

KAATZ, H-H., HILDERBRANDT, H. et ENGELS, W., 1992. Primer effect of queen mandibular pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. *J Comp Physiol B* 162, 588-592.

KAMINSKI, I.A., SLESSOR, K.N., WINSTON, M.L., HAY N.W. et BORDEN, J.H., 1990. Honey bee response to queen mandibular pheromone in a laboratory bioassay. *J Chem Ecol* 16, 841-849.

KARLSON, P. et LÜSCHER, M., 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active substance. *Nature* 183, 55-56.

KATZAV-GOZANSKY, T., 1999. Social and Physiological Regulation of Caste Specific Exocrine Secretions of the Honey Bee (*Apis mellifera*). Ph. D., Univ. of Tel-Aviv, Israël. 96p.

- KEELING, C.I., 2001.** Isolation and Identification of new components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. Ph.D. thesis, Simon Fraser University, Burnaby, B.C., Canada. 137p.
- KENT, D.S. et SIMPSON, J.A., 1992.** Eusociality in the Beetle *Austroplatypus incompertus* (Coleoptera: Curculionidae). *Naturwiss* 79, 86-87.
- KING, G.E., 1933.** The larger glands in the worker honey-bee : a correlation of activity with age and with physiological functioning. Ph. D., Univ. of Ill., Urbana.
- KOLMES, S.A., 1985a.** A quantitative study of the division of labor among worker honey bees. *Z Tierpsychol* 68, 287-302.
- KOLMES, S.A., 1985b.** An information theory analysis of task specialization among worker honey bees performing hive duties. *Anim Behav* 33, 181-187.
- KOLMES, S.A., 1986.** Age polyethism in worker honey bees. *Ethology*, 71, 252-255.
- KOLMES, S.A., 1990.** Recent progress in the study of adaptative behavioral flexibility in honey bees. *Z Tierpsychol* 68, 287-302.
- KOLMES, S.A. et WINSTON, M.L., 1988.** Division of labor among worker honey bees in demographically manipulated colonies. *Ins Soc* 35, 262-270.
- KORST, P.J.A.M. et VELTHUIS, H.H.W., 1982.** The nature of trophallaxis in honeybees. *Ins Soc* 29, 209-221.
- LASS, A. et CRAILSHEIM, K., 1996.** Influence of age and caging upon protein metabolism, hypopharyngeal glands and trophallactic behavior in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ins Soc* 43, 347-358.

LE CONTE, Y., ARNOLD, G., TROUILLER, J., MASSON, C, CHAPPE, B. et OURISSON, G., 1989. Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honey bees by simple aliphatic esters. *Science* 245, 638-639.

LE CONTE, Y., ARNOLD, G., TROUILLER, J. et MASSON, C., 1990. Identification of a brood pheromone in honey bees. *Naturwiss* 77, 334-336.

LE CONTE, Y., SRENG, L. et TROUILLER, J., 1994. The Recognition of larvae by Worker Honeybees. *Naturwiss* 81, 462-465.

LE CONTE, Y., SRENG, L. et POITOUT, S.H., 1995a. Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (hymenoptera: Apidae). *J Econ Entomol* 88, 798-804.

LE CONTE, Y., SRENG, L., SACHER, N., TROUILLER, J., DUSTICIER, G. et POITOUT, S.H., 1995b. Chemical recognition of queen cells by honey bee workers *Apis mellifera* (Hymenoptera :Apidae). *Chemo-ecology*. 1, 6-12.

LE CONTE, Y., MOHAMMEDI, A. et ROBINSON, G.E., 2001. Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proc R soc Lond B* 268, 163-168.

LEDOUX, M.N, WINSTON, M.L., KEELING, C.I., SLESSOR, K.N. et LE CONTE, Y., 2001. Queen and pheromonal factors influencing comb construction by simulated honey bee (*Apis mellifera* L.) swarms. *Ins Soc* 48, 14-20.

LENOIR, A., 1979. Le comportement alimentaire et la division du travail chez la fourmi *Lasius niger*. *Bull Biol Fr Belgique* 113, 79-314.

LIN, H., 1999. Regulation of worker honey bee reproduction *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Ph. D. Simon Fraser University, Burnaby, B.C., Canada.

LINDAUER, M., 1952. Ein Beitrag zur Frage der Arbeitsteilung im Bienenstaat. "On division of labor in honey bee colonies." *Z vergl Physiol* 34, 299-345.

LINDAUER, M., 1953. Division of labour in the honeybee colony. *Bee World* 34, 63-73, 85-91.

LINDAUER, M., 1954. Temperaturregulierung und Wasserhaushalt im Bienenstaat. *Z vergl Physiol* 36, 391-432.

LINDAUER, M., 1961. Communication among social bees. Cambridge, MA: Harvard University Press.

LISSMAN, H.W., 1963. Electric location by fishes. *Scien Am* 208, 50-59.

LOUVEAUX, J., 1966. Les modalités de l'adaptation des abeilles (*Apis mellifica* L.) au milieu naturel. *Ann Abeille* 9, 323-350.

MAURIZIO, A., 1962. Zuckerabbau.5. Einfluss von alter und ernährung der bienen auf die fermentaktivität der pharynxdrüsen. *Ann Abeille* 5, 215-232.

MELATHOPOULOS, A.P., WINSTON, M.L., PLETTIS, J.S. et PANKIW, T., 1996. Effect of queen mandibular pheromone on initiation and maintenance of queen cells in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Can Entomol* 128, 263-272.

MERCIER, P., 1991. Analyse des relations espèces-environnement et étude de la co-structure d'un couple de tableaux. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1, 168 p.

MICHENER, C.D., 1968. Nests of some african Megachilid, with description of a new *Hoplitis*. *J Entomol Soc Southern Africa* 31, 337-359.

MICHENER, C.D., 1974. The social behavior of the bees: a comparative study. Belknap Press of Harvard University Press; Cambridge, Massachusetts (USA). 404 p.

MICHENER, C.D. et KERFOOT, W.B., 1967. Nests and social behavior of three species of *Pseudaugochloropsis*. *J Kansas Entomol Soc* 40, 214-232.

MILUM, V.G., 1955. Honey bee communication. *Amer Bee J.* 95, 97-104.

MILOJEVIC, B.D., 1940. A new interpretation of the social life of the honeybee. *Bee World* 21, 39-41.

MOHAMMEDI, A., CRAUSER, D., PARIS, A. et LE CONTE, Y., 1996. Effect of a brood pheromone on honeybee hypopharyngeal glands. *C. R. Acad. Sci.* 319, 769-772.

MOORE, A.J., BREED, M.D. et MOOR, M.J., 1987. The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Anim. Behav.* 35, 1159-1167.

MOORE, D., ANGEL, J.E., CHEESEMAN, I.M. et ROBINSON G.E., 1998. Timekeeping in the honey bee colony : integration of circadian rhythms and division of labor. *Behav. Ecol. Sociobiol* 43, 147-160.

MORITZ, B. et HALLMEN, M., 1986. Trophallaxis of worker honeybees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Ins Soc.* 33, 26-31.

MORITZ, B. et CRAILSHEIM, K., 1987. Physiology of protein digestion in the midgut of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *J Insect Physiol* 33, 923-931.

NAIEM, E.S., HRASSNIGG, N. et CRAILSHEIM, K., 1999. Nurse bees support the physiological development of young bees (*Apis mellifera* L.). *J Comp Physiol B* 169, 271-279.

NAUMANN, K. et WINSTON, M.L., 1990. Effects of package production on temporal caste polyethism in honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am* 83 (2), 264-270.

NAUMANN, K., WINSTON, M.L., SLESSOR, K.N., PRESTWICH, G.D. et WEBSTER, F.X., 1991. Production and transmission of honey bee queen (*Apis mellifera* L.) mandibular pheromone. *Behav Ecol Sociobiol* 29, 321-332.

NAUMANN, K., WINSTON, M.L., SLESSOR, K.N., PRESTWICH, G.D. et LATLI, B., 1992. Intra-nest transmission of aromatic honey bee queen mandibular gland pheromone components: movement as a unit. *Can entomol* 124, 917-934.

NELSON, F.C., 1927. Adaptability of young bees under adverse conditions. *Am. Bee J.* 67, 242-243.

NIXON, H.L. et RIBBANDS, C.R., 1952. Food transmission within the honeybee community. *Proc Roy Soc London* 140, 43-50.

NOIROT, C., 1989. Social structure in termites societies. *Ethol Ecol Evol* 1, 1-17.

NOLAN, W.J., 1924. The division of labor in the honey-bee. *NC beekeeper* (Oct), 10-15.

OSTER, G.F. et WILSON, E.O., 1978. *Caste and Ecology in the Social Insects*. Princeton Univ Press, Princeton, NY.

PAGE, R.E., 1986. Sperm utilization in social insects. *Annu Rev Entomol* 31, 297-320.

PAGE, R.E. et LAIDLAW, H.H., 1988. Full sisters and super sisters : a terminological paradigm. *Anim Behav* 36, 944-945.

- PAGE, R.E., ROBINSON, G.E. ET FONDRK, M.K., 1989.** Genetic specialists, kin recognition and nepotism in honey bee colonies. *Nature* 338, 576-579.
- PAGE, R.E., ROBINSON, G.E., BRITTON, D.S. et FONDRK, M.K., 1992.** Genotypic variability for rates of behavioral development in worker honeybees (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 3, 173-180.
- PAGE, R.E. et ROBINSON, G.E., 1994.** Reproductive competition in queenless honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) *Behav Ecol Sociobiol* 35, 99-107.
- PAGE, R.E., ROBINSON, G.E., FONDRK, M.K. et NASR, M.E., 1995.** Effects of worker genotypic diversity on honey bee colony development and behavior (*Apis mellifera* L.). *Behav Ecol Sociobiol* 36, 387-396.
- PAINTER-KURT, S. et SCHNEIDER, S.S., 1998.** Age and behavior of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) that perform vibration signals on queens and queen cells. *Ethology* 104, 475-485.
- PANKIW, T., HUANG, Z.Y., WINSTON, M.L. et ROBINSON, G.E., 1998.** Queen mandibular qlang pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *J Insect Physiol* 44, 685-692.
- PANKIW, T., WINSTON, M.L., FONDRK, M.K. et SLESSOR, K.N., 2000.** Selection on worker honey bees response to queen pheromone (*Apis mellifera* L.). *Naturwiss* 87, 487-490.
- PARK, O.W., 1923.** Water stored by bees. *Am Bee J* 63, 348-349.
- PATEL, N.G., HAYDAK, M.H. et GOCHNAUER, T.A., 1960.** Electrophoretic components of the proteins in honeybee larval food. *Nature*. 186, 633-634.

PAULMIER, I., 1994. Ecologie chimique de l'abeille solitaire *Megachile rotundata* Fabricius., Thèse de doctorat, Université Paris VI, France. 165 p.

PETTIS, J.S., WINSTON, M.L. et COLLINS, A.M., 1995. Suppression of queen rearing in European and Africanized honey bees *Apis mellifera* L. by synthetic queen mandibular gland pheromone. *Ins Soc.* 42, 113-121.

PERPELOVA, L., 1928. Materials concerning the biology of the bee: the work of the bees in the hive. *Opuit Pas.* 11, 492-502.

PHAM-DELEGUE, R.H., MASSON, C and DOUAULT, P., 1984. Etude Comparée, effectuée au laboratoire, des aptitudes au butinage des abeilles de subspecies *mellifica*, *ligustica* et d'hybrides interraciaux *Apis mellifica (ligustica x caucasica) x mellifica*. *Apidologie* 15, 33-42.

RATNIEKS, F.L.W. and ANDERSON, C., 1999. Task partitioning in insect societies. *Ins Soc* 46, 95-108.

RIBBANDS, C.R., 1952. Division of labour in the honeybee community; *Proc. Roy. Soc. London (B)* 140, 32-42.

RIBBANDS, C.R., 1953. The behaviour and social life of honeybees. *London: Bee Research Association.* 352 p.

RIDDIFORD, L.M., 1985. Hormone action at the cellular level. *Compr Ins Physiol Biochem Pharmacol* 8, 37-84.

RIESSBERGER, U. and CRAILSHEIM, K., 1997. Short-term effect of different weather conditions upon the behaviour of forager and nurse honey bee (*Apis mellifera carnica* Pollmann). *Apidologie.* 28, 411-426.

- ROBINSON, G.E., 1985.** Effects of juvenile hormone analogue on honey bee foraging behaviour and alarm pheromone production. *J Insect Physiol* 34, 277-282.
- ROBINSON, G.E., 1987a.** Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20, 329-338.
- ROBINSON, G.E., 1987b.** Modulation of alarm pheromone perception in the honey bee: evidence of division of labor based on hormonally regulated response thresholds. *J. Comp. Physiol. A* 160, 613-619.
- ROBINSON, G.E., 1992.** Regulation of division of labor in insect societies. *Annu Rev Entomol* 37, 637-665.
- ROBINSON, G.E. et RATNIEKS, F.L.W., 1987.** Induction of premature honey bee (Hymenoptera: Apidae) flight by juvenile hormone analogs administered orally or topically. *J Econ Entomol* 80, 784-787.
- ROBINSON, G.E. et PAGE, J.R., 1988.** Genetic determination of guarding and undertaking in honey bee colonies. *Nature* 333, 356-358.
- ROBINSON, G.E. et PAGE, J.R., 1989.** Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 24, 317-323.
- ROBINSON, G.E., PAGE, R.E., STRAMBI, C. et STRAMBI, A., 1989.** Hormonal and genetic control of behavioral integration in Honey bee colonies. *Science* 246, 109-112.1989.
- ROBINSON, G.E., PAGE, R.E., STRAMBI, C. et STRAMBI, A., 1992.** Colony integration in honey bees: mechanisms of behavioural reversion. *Ethology* 90, 336-350.

ROBINSON, G.E., PAGE, J.R. et HUANG, Z.Y., 1994. Temporal polyethism in social insects is a developmental process. *Anim behav* 48, 467-469.

ROBINSON, G.E. et PAGE, J.R., 1995. Genotypic constraints on plasticity for corpse removal in honey bee colonies. *Anim Behav* 49, 867-876.

ROBINSON, G.E., STRAMBI, C., STRAMBI, A et HUANG, Z.Y., 1992. Reproduction in worker honey bees is associated with low JH titers and rates of biosynthesis. *Gen Comp endocrinol* 87, 471-480.

ROBINSON, G.E., FAHRBACH, S.E. et WINSTON, M.L., 1997. Insect societies and molecular biology of social behavior. *Bio Assays* 19, 1099-1108.

ROBINSON, G.E. et VARGO, 1997. Juvenile hormone in adult eusocial hymenoptera: gonadotropin and behavioral pacemaker. *Arch Ins Biochem Physiol* 35, 559-583.

ROBINSON, G.E. et HUANG, Z.Y., 1998. Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie* 29, 159-170.

RÖSCH, G.A., 1925. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat, I. Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Z vergl Physio* 2, 571-631.

RÖSCH, G.A., 1927 a. Über die Bautätigkeit im Bienenvolk und das Alter der Baubienen. Weiterer Beitrag zur Frage nach der Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z vergl Physiol* 6, 265-298.

RÖSCH, G.A., 1927 b. Beobachtungen an Kittharz-sammelnden Bienen (*Apis mellifera* L.). *Biol Zbl* 47, 113-121.

RÖSCH, G.A., 1930. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. II. Die Tätigkeiten der Arbeitsbienen unter experimentell veränderten bedingunen.. *Z vergl Physiol* 12, 1-71.

ROSS, K.G. et KELLER, L., 1998. Genetic control of social organization in an ant. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14232-14237.

RUTTNER, F., 1968. Les races d'abeilles, dans *Le traité de Biologie de l'Abeille*. Tome 1. Chauvin, R, Ed. Masson et Cie, Paris. 27-44.

RUTTNER, F., 1988. Biogeography and Taxonomy of Honeybees. New york: Springer-Verlag. 284p.

RUTZ, W., GERIG, L., WILLE, H. et LÜSCHER, M., 1976. The function of juvenile hormone in adult worker honeybees, *Apis mellifera*. *J Insect Physiol* 22, 1485-1491.

SAKAGAMI, S.F., 1953. "Division of labor in a colony of noney bees. Studies in the biology of the honey bee *Apis mellifera* L." *Jap J Zool* 11, 117-185. (en all.).

SASAGAWA, H., SASAKI, M. et OKADA, I., 1989. Hormonal control of the division of labor in adult honey bees (*Apis mellifera* L.).I. Effect of methoprene on corpora allata and hypopharyngeal gland, and its alpha-glucosidase activity. *Appl Entomol Zool* 24, 66-77.

SCHAL C., SEVALA V., SNYDER T., CAPURRO M. de L., BLOMQUIST G.J. et BAGNERES A.G., 2001. Tissue distribution and lipophorin transport of hydrocarbons and sex pheromones in the house fly, *Musca domestica*. *J Ins Sci* 1-12.

SCHULZ, D.J., HUANG, Z.Y. et ROBINSON, G.E., 1998. Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behav Ecol Sociobiol* 42, 295-303.

SCHULZ, D.J et ROBINSON, G.E., 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *J Comp Physiol A* 184, 481-488.

SCHULZ, D.J et ROBINSON, G.E., 2001. Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* 187, 53-61.

SCHNEIDER, S.S., 1987. The modulation of work activity by the vibration dance of the honey bee, *Apis mellifera*. *Ethology* 74, 211-218.

SCHNEIDER, S.S., STAMPS, J.A. et GARY, N.E., 1986a. The vibration dance of the honey bee, I. Communication regulating foraging on two time scales. *Anim Behav* 34, 366-385.

SCHNEIDER, S.S., STAMPS, J.A. et GARY, N.E., 1986b. The vibration dance of the honey bee, II. The effects of foraging success on daily patterns of vibration activity. *Anim Behav* 34, 386-391.

SCHNEIDER, S.S. et MCNALLY, L.C., 1991. The vibration dance behavior of queenless workers of the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) *J. Ins Behav* 4, 319-322.

SEELEY, T.D., 1982. Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 11, 287-293.

SEELEY, T.D., 1989. Social foraging in honey bees: how nectar foragers assess their colony's nutritional status. *Behav Ecol Sociobiol* 24, 181-199.

SEELEY, T.D. et KOLMES S.A., 1991. Age polyethism for hive duties in honey bees - illusion or reality? *Ethology* 87, 284-297.

SEKIGUSHI, K. et SAKAGAMI, S.F., 1966. Structure of foraging population and related problems in the honeybee, with considerations on the division of labor in bee colonies. *Hokkaido Nat Agric Exp Sta Rep* 69, 1-65.

SHEARER, D.A. et BOCH, R., 1965. 2-Heptanone in the mandibular gland secretion of the honey bee. *Nature* 206, 530.

SHEPPARD, W.S., 1997. Subspecies of *Apis mellifera*. In: honey Bee Pests, Predators and Diseases (Morse, R.A. and Flottum, K., eds). AI Root Co. Medina, OH, 519-533.

SHERMAN, P. W., ALEXANDER, R. D. et JARVIS J. U., 1991. The Biology of the Naked Mole-Rat. Princeton University Press.

SCHMIDT, J.O., 1984. Feeding preferences of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae): individual versus mixed pollen species. *J. Kansas Entomol Soc* 57, 323-327.

SIMPSON, J., 1960. The function of the salivary glands of *Apis mellifera*. *J Ins Physiol* 4, 107-121.

SIMPSON, J., 1979. The existence and physical properties of pheromones by which worker honeybees recognise queens. *J Apic Res* 18, 232-249.

SIMPSON, J., RIEDEL, I.B.M. et WILDING, N., 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *J Apic Res* 7, 29-36.

SLESSOR, K.N., KAMINSKI, I.A., KING, G.G.S., BORDEN, H. et WINSTON, M.L., 1988. Semiochemical basis of the retentive response to queen honey bees. *Nature* 332, 354-356.

SMITH, M.V., 1959. Queen differentiation and the biological testing of royal jelly. *Mem Cornell Univ agric Exp Stn* 356.

SOKAL, R.R. et ROHLF, F.J., 1995. Biometry. Freedman and Compagny ed., New York. 887 p.

SOULAGES, J.L. et WELLS, M.A., 1994. Lipophorin: the structure of an insect lipophorin and its role in lipid transport in insects. *Adv Prot Chem* 45, 371-415.

SPRENT, P., 1992. Pratiques des statistiques non paramétriques. INRA, éditions, Paris. 294 p.

STOCKHAMMER, K.A., 1966. Nesting habits and life cycle of a sweat bee, *Augochlora pura*. *J Kansans Entomol Soc* 39, 157-192.

SULLIVAN, J.P., JASSIM, O., FAHRBACH, S.E. et ROBINSON, G.E., 2000. Juvenile hormone paces behavioural development in the adult worker honey bee. *Horm. Behav.* 37, 1-14.

SZABO, T.I., 1980. Effect of weather factors on honeybee flight activity and colony weight gain. *J Apic Res* 19, 164-171.

TOBE, S.S. et STAY, B., 1985. Structure and regulation of the *corpus allatum*. *Adv Ins Physiol* 18, 305-432.

TOMA, D.P., BLOCH, G., MOORE, D. et ROBINSON, G.E., 2000. Changes in *period* mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies. *Proc Nat Acad Sci USA* 97, 6914-6919.

TRANCHANT, J., 1983. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. Masson (Ed), Paris, 504 p.

- TROUILLER, J., ARNOLD, G., LE CONTE, Y. et MASSON, C., 1992.** Semiochemical basis of infestation of honeybee brood by *Varroa jacobsoni*. *J Chem Ecol* 18, 2041-2053.
- TROUILLER, J., 1993.** La communication chimique inter- et intra- spécifique chez l'abeille. Relations abeille-Varroa, couvain-ouvrière et reine-ouvrière. Thèse de doctorat, Université de Paris VII, Paris, France ; 149 p.
- TRUMBO, S.T., HUANG, Z.Y. et ROBINSON, G.E., 1997.** Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Behav Ecol Sociobiol* 41, 151-163.
- TOFTS, C. et FRANKS N.R., 1992.** Doing the right thing: ants, honeybees and naked mole-rats. *Trends Ecol Evol* 7, 346-349.
- TORRE, F., 1996.** Analyse de co-structure de deux tableaux totalement appariés : application à la comparaison de deux méthodes d'échantillonnage en écologie. Thèse no 316-96, Université Claude Bernard Lyon 1, 175 p.
- VERRON, H., 1981.** Polyethism and population genetics. From Biosystematics of social insects. The Systematics Association special Volume 1. Ed. P.E. Howse and J.L. Clement; London.
- VISSCHER, P. K., 1983.** The honey bee way of death: necrophoric behaviour in *Apis mellifera* colonies. *Anim behav* 31, 1070-1076.
- VISSCHER, P. K et CAMAZINE, S., 1999.** Collective decisions and cognition in bees. *Nature* 397, 400.
- VOLLRATH, F., 1986.** Eusociality and extraordinary sex ratios in the spider *Anelosimus eximius* (Araneae: Theridiidae). *Behav Ecol Sociobiol* 18, 283-287.

WAKANO, J.Y., NAKATA, K. et YAMAMURA, N., 1998. Dynamic model of optimal age polyethism in social insects under stable and fluctuating environments. *J theor Biol* 193, 153-165.

WAGENER-HULME, C., KUEHN, J.C., SCHULZ, D.J. et ROBINSON, G.E., 1999. Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *J Comp Physiol A* 184, 471-479.

WILLIS, L.G., WINSTON, M.L. et SLESSOR, K.N., 1990. Queen honey bee mandibular pheromone does not affect worker ovary development. *Can Entomol* 122, 1093-1099.

WILSON, E.O., 1962. Pheromones. *Sci Amer* 208, 100-114.

WILSON, E.O., 1971. *The Insect Societies*. The Belknap Press of the Harvard University Press, Cambridge, MA. 548 p.

WILSON, E.O., 1975. *Sociobiology. The new Synthesis*. Harvard University press, Cambridge, MA. 667 p.

WILSON, E.O., 1984. The relation between caste ratios and division of labor in the genus *Pheidole* (Hymenoptera: Formicidae) *Behav Ecol Sociobiol* 16, 89-98.

WILSON, E.O., 1985. The sociogenesis of insect colonies. *Science* 228, 1489-1496.

WILSON, E.O. et HÖLLDOBLER, B., 1988. Dense heterarchies and mass communication as the basis of organization in ant colonies. *Trends Ecol Evol* 3, 65-68.

WINSTON, M.L., 1987. *The biology of the Honeybee*. Harvard Univ Press, Cambridge, MA. 281 p.

WINSTON, M.L. et KATZ, S.J., 1982. Foraging differences between cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Behav Ecol Sociobiol* 10, 125-129.

WINSTON, M.L. et PUNETT, E.N., 1982. Factors determining temporal division of labor in honeybees. *Can J Zool* 60, 2947-2952.

WINSTON, M.L. et FERGUSSON, L.A., 1985. The effect of worker loss on temporal caste structure in colonies of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Can J Zool* 63, 777-780.

WINSTON, M.L., SLESSOR, K.N., WILLIS, L.G., NAUMANN, H.A., HIGO, H.A., WYBORN, M.H. et KAMINSKI, L.A., 1989. The influence of queen mandibular pheromones on workers attraction to swarm clusters and inhibition of queen rearing in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Ins Soc* 36, 15-27.

WINSTON, M.L., HIGO, H.A. et SLESSOR, K.N., 1990. Effect of various dosages of queen mandibular gland pheromone on the inhibition of queen rearing in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Ann Entomol Soc Am* 83, 234-238.

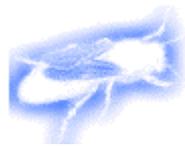
WINSTON, M.L. et SLESSOR, K.N., 1992. The essence of royalty: honey bee queen pheromone. *Am Sci* 80, 374-385.

WITHERS, G.S., FAHRBACH, S.E. et ROBINSON, G.E., 1993. Selective neuroanatomical plasticity and division of labour in the honeybee. *Nature* 364, 238-240.

WITHERS, G.S., FAHRBACH, S.E. et ROBINSON, G.E., 1995. Effects of experience and juvenile hormone on the organization of the mushroom bodies of the honey bees. *J Neurobiol* 26, 130-144.

WOSSLER, T.C. et CREWE, R.M., 1999. Mass spectral identification of the tergal gland secretions of female castes of two African honey bee races (*Apis mellifera*). *J Apic Res* 38, 137-148.

Annexes



Données brutes

Expériences comportementales en ruche vitrée

But : observations des comportements des abeilles d'âge connu en présence ou non de butineuses.

Question : inhibition comportementale?

➤ Comparaisons des sommes des observations de chaque comportement entre les deux ruches :

	Ruche A1	Ruche B1	Ruche A2	Ruche B2	Ruche A3	Ruche B3
Insp cellule	280	58	191	126	340	66
Contact ant	64	25	35	65	29	31
VDV	3	47	10	78	2	36
Trophallaxie	13	13	5	19	0	5
Tête dans cel.	23	7	56	34	61	11
Marche	59	28	153	134	130	82
Marche vite	13	10	7	70	11	98
Immobile	89	58	332	231	172	61
Autonet.	42	16	51	62	40	34

Série 1

➤ Ruche A1 colonie à simple cohorte : contenant 1100 abeilles émergentes marquées
et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	06-avr	06-avr	06-avr	06-avr	07-avr	07-avr	07-avr	07-avr	08-avr	08-avr	08-avr	09-avr	09-avr	09-avr	09-avr
Insp cellule	20	15	11	3	21	26	16	15	16	16	9	28	15	2	4
Contact ant	10	9	9	5	6	1	2	2	2	3	1	1	4	2	1
VDV	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Trophallaxie	1	1	0	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	3	2
Tête dans cel.	3	4	1	0	2	0	0	0	1	2	1	0	3	1	2
Marche	7	6	8	5	2	7	2	2	1	1	7	2	1	0	5
Marche vite	1	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Immobile	1	2	4	1	2	9	3	3	12	14	2	12	9	1	4
Autonet.	2	4	2	7	0	0	7	7	2	1	2	2	2	3	0

DATE	10-avr	10-avr	10-avr
Insp cellule	16	25	22
Contact ant	3	2	1
VDV	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0
Tête dans cel.	0	1	2
Marche	1	1	1
Marche vite	0	0	0
Immobile	8	1	1
Autonet.	1	0	0

➤ **Ruche B1 colonie à double cohorte** : contenant 1000 abeilles émergentes marquées
et 100 butineuses et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	06-avr	06-avr	06-avr	06-avr	07-avr	07-avr	07-avr	07-avr	08-avr	08-avr	08-avr	09-avr	09-avr	09-avr	09-avr
Insp cellule	7	9	12	11	0	11	0	0	0	3	3	0	0	0	2
Contact ant	1	2	8	0	1	4	0	0	0	2	3	0	1	1	0
VDV	3	0	10	12	3	4	5	4	0	3	2	0	0	0	1
Trophallaxie	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	3	1	3	0
Tête dans cel.	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	1	0	0
Marche	3	2	5	5	1	3	3	0	0	3	2	0	0	0	0
Marche vite	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	3	4	1	0
Immobile	7	6	7	14	0	10	3	0	0	3	3	0	0	1	0
Autonet.	3	4	2	0	0	1	0	0	0	2	2	0	0	1	0

DATE	10-avr	10-avr	10-avr
Insp cellule	0	0	0
Contact ant	2	0	0
VDV	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0
Tête dans cel.	0	0	0
Marche	1	0	0
Marche vite	0	0	0
Immobile	4	0	0
Autonet.	1	0	0

Série 2

- **Ruche A2 colonie à simple cohorte** : contenant 1100 abeilles émergentes marquées
et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	21-avr	21-avr	21-avr	22-avr	22-avr	22-avr	23-avr	23-avr	23-avr	23-avr	25-avr	25-avr	26-avr	26-avr	27-avr	27-avr
Insp cellule	6	6	6	9	3	8	4	6	8	5	6	8	0	0	10	11
Contact ant	1	2	1	4	4	0	2	4	0	1	0	1	3	4	1	0
VDV	0	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
Tête dans cel.	1	0	0	0	1	0	2	1	1	12	4	2	5	6	4	5
Marche	6	6	5	7	8	5	5	1	5	2	3	3	5	4	5	4
Marche vite	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Immobile	9	12	13	10	18	18	11	19	31	16	17	13	14	13	16	12
Autonet.	2	1	1	0	0	1	1	1	2	0	2	2	3	2	1	0

DATE	02-mai	02-mai	03-mai	03-mai	05-mai	05-mai	06-mai	06-mai	07-mai	07-mai
Insp cellule	7	6	10	10	6	4	7	6	19	20
Contact ant	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1
VDV	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Tête dans cel.	0	0	3	0	1	3	1	1	2	1
Marche	3	4	9	5	6	13	15	12	6	6
Marche vite	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0
Immobile	14	16	6	4	5	9	8	6	12	10
Autonet.	2	2	6	0	11	6	1	2	1	1

- **Ruche B2 colonie à double cohorte** : contenant 1000 abeilles émergentes marquées et 100 butineuses et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	21-avr	21-avr	21-avr	22-avr	22-avr	22-avr	23-avr	23-avr	23-avr	23-avr	25-avr	25-avr	26-avr	26-avr	27-avr	27-avr
Insp cellule	6	29	30	4	0	0	7	2	0	1	11	4	3	0	6	5
Contact ant	6	6	5	1	5	4	9	1	0	2	7	2	1	0	1	2
VDV	8	7	8	2	0	0	11	1	2	0	10	7	0	2	2	3
Trophallaxie	0	0	0	4	2	3	0	0	1	0	0	3	0	0	1	2
Tête dans cel.	2	5	5	0	0	0	1	1	0	1	2	3	1	0	2	3
Marche	18	4	3	1	6	5	8	4	14	5	24	7	1	1	4	5
Marche vite	0	2	1	9	2	3	1	21	6	5	1	7	0	0	0	0
Immobile	26	23	20	8	5	4	37	1	1	4	12	4	1	8	16	15
Autonet.	4	3	5	0	4	5	4	0	0	2	5	3	3	2	3	4

DATE	02-mai	02-mai	03-mai	03-mai	05-mai	05-mai	06-mai	06-mai	07-mai	07-mai
Insp cellule	2	2	0	3	1	2	1	1	3	3
Contact ant	0	0	0	0	0	6	2	2	2	1
VDV	2	1	3	1	1	4	0	0	1	2
Trophallaxie	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Tête dans cel.	2	3	0	1	0	0	0	0	1	1
Marche	4	5	1	3	3	4	1	1	1	1
Marche vite	0	0	2	3	3	0	1	1	1	1
Immobile	9	8	2	5	0	2	6	6	4	4
Autonet.	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1

Série 3

- Ruche A3 colonie à simple cohorte : contenant 1100 abeilles émergentes marquées et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	26-avr	26-avr	26-avr	26-avr	27-avr	27-avr	27-avr	28-avr	28-avr	30-avr	30-avr	02-mai	02-mai	03-mai	03-mai	05-mai	05-mai
Insp cellule	14	29	28	42	22	17	17	29	18	18	17	1	1	2	9	4	4
Contact ant	3	1	2	1	1	0	1	1	1	1	2	1	2	0	1	2	2
VDV	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tête dans cel.	4	5	2	9	1	6	3	2	1	1	2	4	5	0	0	4	4
Marche	1	4	11	3	3	10	5	5	1	3	4	12	10	4	3	5	5
Marche vite	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2	3	1	1
Immobile	23	10	12	6	9	3	0	2	7	15	12	9	10	5	2	4	4
Autonet.	2	2	3	3	0	1	3	0	6	3	2	0	0	0	0	3	3

DATE	06-mai	06-mai	07-mai	07-mai	07-mai	08-mai	08-mai	09-mai	09-mai
Insp cellule	7	6	12	7	4	6	5	10	11
Contact ant	0	0	3	0	1	1	2	0	0
VDV	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Trophallaxie	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tête dans cel.	1	1	0	0	1	2	1	2	0
Marche	3	4	4	4	7	6	5	6	2
Marche vite	0	0	1	1	0	0	0	0	0
Immobile	6	6	3	2	0	6	7	3	6
Autonet.	0	0	3	2	1	0	0	2	1

- **Ruche B3 colonie à double cohorte** : contenant 1000 abeilles émergentes marquées et 100 butineuses et 50 abeilles émergentes numérotées

DATE	26-avr	26-avr	26-avr	26-avr	27-avr	27-avr	27-avr	28-avr	28-avr	30-avr	30-avr	02-mai	02-mai	03-mai	03-mai	05-mai	05-mai
Insp cellule	12	6	1	2	11	2	1	0	0	1	0	1	1	1	9	2	2
Contact ant	3	2	0	1	4	4	1	0	1	5	6	0	0	0	0	1	0
VDV	6	4	0	3	7	2	0	0	0	1	2	2	2	3	1	0	0
Trophallaxie	0	1	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tête dans cel.	1	3	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Marche	14	9	1	9	12	0	8	3	0	5	5	1	1	4	1	2	3
Marche vite	1	4	10	2	0	20	4	23	6	12	10	0	0	2	0	1	2
Immobile	13	4	0	3	26	0	0	0	0	0	0	4	4	0	1	0	0
Autonet.	5	1	0	1	0	1	0	0	1	4	6	0	0	0	3	0	0

DATE	06-mai	06-mai	07-mai	07-mai	07-mai	08-mai	08-mai	09-mai	09-mai
Insp cellule	5	4	2	2	0	0	0	1	0
Contact ant	1	2	0	0	0	0	0	0	0
VDV	0	0	0	1	0	1	1	0	0
Trophallaxie	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tête dans cel.	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Marche	1	2	0	1	0	0	0	0	0
Marche vite	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Immobile	1	2	0	1	0	0	0	1	1
Autonet.	2	3	1	0	3	0	0	2	1

