Apidologie, 1970, **1** (1), 29-54.

VARIATION ANNUELLE DE L'ACIDE HYDROXY-10 DÉCÈNE-2 OÏQUE DANS LES TÊTES D'ABEILLES

Über die Veränderung des 10-Hydroxy-2-Decensäure-Gehaltes in Bienenköpfen im Verlauf eines Jahres

Janine PAIN et Bernard ROGER

Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux
91 – Bures-sur-Yvette
Institut national de la Recherche agronomique

SUMMARY

ANNUAL VARIATION OF 10-HYDROXY-DEC-2-ENOIC ACID IN THE HEADS OF BEES

Having a dosage technique through chromatographic liquid gas, we have studied the presence of 10-hydroxy-dec-2-enoic acid in the heads of worker-bees of known age. We have examined the production cycle of this acid for one year, by taking regularly, each week, 50 marked workers aged from 16 ± 2 days from the same experimental hive.

We indicate the method for preparing the methylated cephalic extracts as well as the synthesized samples methyl esters 10-hydroxy-dec-2-enoic acid. The results are given in μg per bee.

They allow us to show the existence of two factors :

1° The presence of the brood is essential. It plays a part throughout the year, principally however at the beginning and the end of the colony's development as well as during hibernation. Its action has been tested (test F).

2° The process of renewal of nurse-bees has a predominant effect on that of the brood while the colony is in full development.

On the other hand, a monthly evaluation of the quantities of 10-hydroxy-dec-2-enoic acid has enabled us to produce a diagram of production and evolution of this acid.

The results obtained are discussed in conjunction with those of Boch and Shearer (1967). The maximum values obtained are of the same order.

Finally, we compare our work with those dealing with the seasonal cycle of other substances and the development of cephalic glands in relation to the brood.

RÉSUMÉ

Disposant d'une technique de dosage par chromatographie gaz-liquide, nous avons étudié la présence d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes d'ouvrières d'âge connu. Nous avons examiné le cycle de production de cet acide pendant un an, en prélevant régulièrement chaque semaine dans la même ruche expérimentale 50 ouvrières marquées âgées de 16 ± 2 jours.

Nous indiquons la façon de préparer les extraits céphaliques méthylés ainsi que les échantillons d'esters méthyliques d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque de synthèse. Les résultats sont exprimés en μg par abeille.

Ils nous permettent de mettre en évidence l'existence de deux facteurs :

1° La présence du couvain est primordiale. Elle joue tout au long de l'année, mais surtout au début et à la fin du développement de la colonie ainsi que pendant l'hivernage. Son action a été contrôlée par le test F.

2° Le processus du renouvellement des nourrices exerce une action prépondérante sur celle du couvain lorsque la colonie est en plein développement.

D'autre part, évaluant mensuellement les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, nous en avons dégagé un schéma général de production et d'évolution de cet acide.

Les résultats acquis sont discutés en liaison avec ceux de BOCH et SHEARER (1967). Les valeurs maximales obtenues sont du même ordre.

Enfin, nous comparons notre travail avec ceux qui concernent le cycle saisonnier d'autres substances et le développement des glandes céphaliques en relation avec le couvain.

INTRODUCTION

L'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, αβ insaturé est un acide gras spécifique des produits de la ruche et des abeilles. Ainsi, on le trouve dans la gelée royale (TOWNSEND et LUCAS, 1940; ABBOT et FRENCH, 1945; BUTENANDT et REMBOLD, 1957; MACK, 1959; BARKER, FOSTER, LAMB, HOGSON, 1959; BROWN, FREURE, 1959) et dans la gelée d'ouvrières (BUTENANDT et REMBOLD, 1957; BARKER, FOSTER, LAMB, JACKMAN, 1959).

Chez les ouvrières, sa présence est signalée dans les glandes mandibulaires (BARKER, FOSTER, LAMB, JACKMAN, 1959; CALLOW, JOHNSTON, SIMPSON, 1959; BARBIER, PAIN, 1960) et dans les glandes hypopharyngiennes (REMBOLD, HANSER, 1960), chez les reines, dans les grandes mandibulaires des adultes (CALLOW, CHAPMAN, PATON, 1964) et dans les larves royales (PAIN, BARBIER, BOGDANOVSKY, LEDERER, 1962).

Des auteurs canadiens (BROWN, FELAUER, 1961) ont pensé que l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque était un précurseur de l'acide céto-9 décène-2 oïque, la phérormone I de la reine d'abeilles que nous étudions depuis plusieurs années (PAIN, 1955 1961).

Disposant d'une technique de dosage par chromatographie gaz-liquide, nous avons étudié la présence de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières d'abeilles, de la même façon que nous avions étudié la présence de la phérormone I dans les têtes des reines (BARBIER, PAIN, 1960).

Ainsi en 1967, (PAIN, BARBIER, ROGER) nous avons indiqué que le dosage individuel de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières est réalisable. Les quantités trouvées sont faibles si on les compare à celles de phérormone I présente chez les reines. Les variations sont importantes d'une ouvrière à

l'autre. De plus, nous avions fait la remarque qu'entre les séries de dosages, on note des différences dues en partie à l'échelonnement des essais tout au long de l'année apicole. En fonction de ces résultats, nous nous sommes demandé s'il n'existait pas un cycle saisonnier de production de cet acide.

Cette opinion se trouva renforcée par l'analyse détaillée des travaux d'autres auteurs. Ainsi, HANSER et REMBOLD (1960), à propos de la bioptérine trouvée dans les gelées de reines et d'ouvrières considèrent que les variations quantitatives observées sont saisonnières. La gelée de larves d'ouvrières de 1 jour ne contient pas la même quantité de bioptérine selon qu'elle est récoltée en mai, en juin, juillet ou août. Par contre, les quantités de bioptérine mises en évidence dans les gelées de larves de reines et de larves d'ouvrières de 4 jours, bien que différentes, ne paraissent pas sous la dépendance de la saison.

Plus tard, BOCH et SHEARER (1967), à propos de l'heptanone-2 trouvée dans les têtes des ouvrières gardiennes et butineuses, constatèrent que les quantités obtenues ne sont pas les mêmes sur deux années d'observations. De plus, au cours d'une même année, les quantités diffèrent suivant les mois. Ils concluèrent à l'existence d'une variation saisonnière dans l'activité sécrétrice des glandes mandibulaires. Cette variation, selon eux, pouvait être due à un cycle d'activité de la colonie. En même temps qu'ils dosèrent l'heptanone-2 ils quantifièrent par la même technique de la chromatographie en phase gazeuze, l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières d'âges différents. Les ouvrières naissantes ne contiennent que très peu de cet acide, résultat que nous avons obtenu en 1960 (BARBIER, PAIN). Puis les quantités augmentent au fur et à mesure que les ouvrières vieillissent. Notons que la valeur maximale de 60 μg par abeille a été trouvée par des ouvrières âgées de 24 jours.

En raison de l'intérêt croissant suscité par l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque et pour vérifier nos hypothèses ainsi que celles des autres auteurs, nous avons entrepris l'étude de la variation de la quantité de cet acide dans les têtes d'ouvrières d'âge connu, pendant toute une année.

MÉTHODES

1. — *Préparation du matériel vivant*

1° *Expériences préliminaires.*

Avant de procéder au dosage de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes d'ouvrières, nous avons entrepris des expériences de mise au point de la méthode afin de pouvoir juger de l'intérêt des résultats.

En premier lieu, pendant un mois, du 7 février au 8 mars 1967, des ouvrières naissantes ont été prélevées dans 2 ruches réactivées par chauffage et alimentation abondante. Elles ont été marquées et introduites dans d'autres ruches également réactivées et disposées dans un local à 20°. Elles ont été prélevées à nouveau lorsqu'elles ont atteint l'âge de 16 ± 2 jours et soumises à l'analyse. Trois lots de 50 de ces ouvrières ont été analysés, le 7, le 15 et le 22 février.

Parallèlement, du 7 février au 1er mars, nous avons prélevé des ouvrières d'âge inconnu dans deux ruches situées à l'extérieur. Nous avons effectué 4 séries d'analyses portant également sur 50 ouvrières, le 7, le 15, le 22 février et le 1er mars.

Les résultats de ces deux expériences nous ont montré une certaine variabilité de la quantité d'acide par abeille. Pour en rechercher la cause, nous avons établi un protocole expérimental devant être suivi pendant un an et qui est exposé ci-dessous.

2° *Expériences systématiques.*

Chaque semaine, à compter du 7 mars 1967 et jusqu'en mars 1968, nous avons prélevé un cadre de couvain naissant. En hiver, le couvain provenait de ruches chauffées auxquelles on distribuait régulièrement pollen, eau et sirop de sucre. Au printemps, en été et en automne, il était retiré de colonies normales appartenant au cheptel de la Station de Bures-sur-Yvette. Les cadres de couvain étaient placés en étuve à la température de 35° pendant 24 ou 48 heures. Les ouvrières naissantes de quelques heures à 24 heures étaient marquées d'une tache de peinture sur le thorax, selon un code bien défini.

Ces marquages étaient effectués le matin de façon à pouvoir introduire les ouvrières l'après-midi dans la ruche expérimentale. Cette seule et unique ruche a toujours servi à recevoir les ouvrières marquées puis à les prélever lorsqu'elles avaient atteint l'âge désiré.

A chaque nouvelle introduction d'ouvrières, nous avons visité la colonie, noté l'état interne de la ruche, le développement de sa population et de son couvain.

Tenant compte des résultats de Boch et Shearer (1967) d'une part et de nos possibilités d'expérimentation d'autre part, nous avons choisi d'effectuer nos dosages sur des ouvrières âgées de 16 $\pm$ 2 jours. A cet âge la teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque est nettement décelable même si elle n'atteint pas sa valeur la plus forte. Au-delà de cette date, pendant la belle saison, les ouvrières marquées ne restent plus à l'intérieur de la ruche. Leur prélèvement devient difficile surtout lorsqu'on désire les capturer à des moments bien déterminés.

Nous avons prélevé 50 abeilles par semaine en vue des dosages. Pour des raisons purement techniques elles ont été réparties en 5 lots de 10 abeilles, les quantités d'acide mesurées étant ensuite simplement additionnées.

2. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque*

Pour extraire l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, nous effectuons des broyats dans l'éther des têtes d'ouvrières. Les extraits obtenus sont filtrés puis concentrés. Ils sont ensuite méthylés en les mettant en présence de diazométhane distillé (CH_2 N_2). L'opération doit s'effectuer rapidement. Après méthylation, les esters sont amenés à sec puis repris par 50 ou 100 µl d'éther. Les solutions sont maintenues à 0 °C avant leur injection dans le chromatographe.

Ces conditions permettent l'analyse correcte du mélange d'esters d'acides aliphatiques de C_8 à C_{16} environ.

La quantité de substance injectée dans le chromatographe a toujours été de 1 µl pour le témoin. Elle correspond à 6 µg d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque de synthèse. Elle est de 2 µl pour les extraits méthylés de têtes d'ouvrières.

Nous avons utilisé un appareil W.G. Pye and Co. Ltd,, Cambridge, G.B., à chambre de détection par ionisation.

Les analyses ont déjà été décrites (J. Pain, M. Barbier, B. Roger, 1967). Nous redonnons cependant les conditions d'utilisation de l'appareil : température 200° – voltage 1 500 – débit de l'argon à la sortie de la colonne 42 ml/mn.

Le temps de rétention de l'hydroxy-10 décène-2 oate de méthyle est de 8 minutes. Il représente le temps de séjour de la substance injectée depuis son introduction en tête de colonne jusqu'à son passage dans le détecteur pour le débit choisi.

Nous avons utilisé la sensibilité maximale. Les limites de détection sont de l'ordre de 0,01 µg.

Chaque extrait d'ouvrières est injecté 2 fois. L'expérience comporte 5 extraits soit 10 injections pour 5 lots de 10 têtes d'ouvrières. La substance témoin est injectée 3 fois au cours d'une même expérience.

Les dosages quantitatifs des extraits céphaliques sont obtenus par la comparaison des aires des pics d'enregistrement avec celles fournies par des échantillons d'esters méthyliques d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque de synthèse.

Signalons que les résultats de Boch et Shearer ont été obtenus chaque jour à partir d'un échantillon de 10 abeilles par jour. Nos dosages ont été effectués chaque semaine, calculés également en µg par abeille mais à partir d'un échantillon de 50 ouvrières.

D'autre part, notre technique est plus simple que celle de Boch et Shearer. Avec le diazométhane, elle est valable avec un acide $\alpha\beta$ insaturé à condition de le faire agir rapidement, ce que nous avons toujours fait. La durée d'action du diazométhane est la même pour tous les lots examinés.

RÉSULTATS

Les expériences préliminaires effectuées en février et mars 1967 et qui ont été décrites plus haut nous donnent les résultats suivants :

1° Abeilles prélevées au hasard dans des ruches non réactivées :

7 février = 22,4 µg par abeille
15 février = 45,4 µg —
22 février = 12,7 µg —
8 mars = 3,5 µg —

2° Abeilles d'âge connu ayant séjourné 15 jours dans des ruches réactivées :

du 7 au 22 février = 32,3 µg par abeille
du 14 au 1er mars = 21 µg —
du 22 au 8 mars = 5,1 µg —

La dissection des glandes mandibulaires des ouvrières nous a montré qu'il n'existait pas de corrélation entre leur développement et leur teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque.

1. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruches chauffées, introduites dans une ruche normale* (fin de l'hiver et printemps 1967)

Les expériences commencées le 7 mars ont continué chaque semaine jusqu'au 3 mai 1967; les jeunes ouvrières provenaient de ruches chauffées. Après marquage, elles étaient introduites dans la ruche expérimentale située à l'extérieur et prélevées 15 jours après, dans la plupart des cas.

Neuf séries successives ont été examinées. La figure 1 donne les quantités moyennes, exprimées en µg par abeille, d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues pour chacune d'elles.

Nous avons cherché à expliquer les différences quantitatives observées. Notre attention s'est portée sur l'état interne de la ruche au moment de l'introduction des ouvrières marquées. Nous avons remarqué que les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque les plus élevées (séries 3, 7 et 8) correspondaient à une surface de couvain operculé plus importante que celle du couvain ouvert. Les quantités d'acide les plus faibles (séries 1, 5 et 9) correspondaient à la présence de cadres contenant de très nombreuses larves et des œufs bien qu'il y ait aussi un peu de couvain operculé. Pour les séries 2, 4 et 6 où les quantités d'acide sont intermédiaires entre les valeurs les plus fortes et les plus faibles, les cadres de couvain contenaient à peu près la même quantité de cellules operculées et non operculées. Ces premières indications montraient déjà l'importance de l'état de mûrissement du couvain.

Au cours de la période considérée, la colonie se développe, le couvain est très homogène. Nous trouvons successivement des œufs, du couvain ouvert puis du couvain operculé. La courbe passe par 2 maximums à peu près espacés de 21 jours, durée qui correspond au développement préimaginal d'une ouvrière. Déjà l'hypothèse d'un rythme de production de cet acide en rapport avec un cycle de développement du couvain nous apparaît intéressante à formuler.

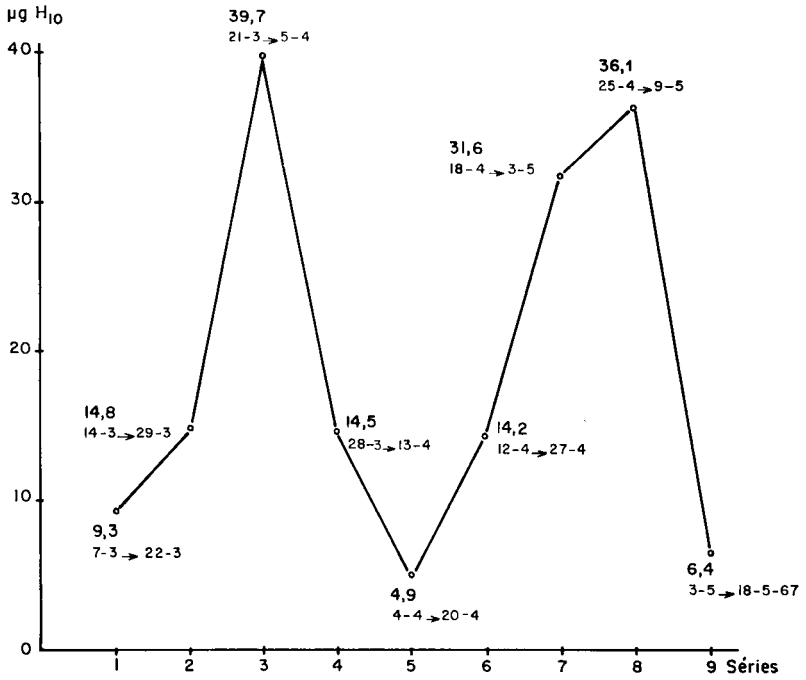

FIG. 1. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille)*

Pour les 9 séries, les ouvrières sont issues de ruches chauffées (fin de l'hiver et printemps 1967).

ABB. 1. — *Durchschnittliche Mengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene)*

Für die 9 Serien wurden die Arbeiterinnen beheizten Stöcken entnommen (Ende des Winters und Frühjahr 1967).

2. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruches normales, introduites dans une autre ruche normale* (fin du printemps et début de l'été 1967)

Du 9 mai jusqu'au 27 juin, les jeunes ouvrières provenant de ruches non réactivées ont été marquées et introduites dans la ruche expérimentale. Elles ont été prélevées après 16 jours ± 2 jours.

Huit séries ont été examinées. La figure 2 indique les quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues pour chacune d'elles et exprimées en µg par abeille.

Les expériences se sont déroulées pendant la période de pleine activité de la colonie expérimentale. Le nombre total de cadres de couvain a augmenté et l'on trouve dans toutes les séries des larves à tous les stades de développement. D'après nos observations sur l'état interne de la ruche receveuse, l'influence du couvain operculé qui se faisait nettement sentir dans les séries précédentes, à l'époque du début du développement de la colonie, ne paraît plus prépondérante au cours de cette nouvelle période. D'autres facteurs interviennent en relation avec

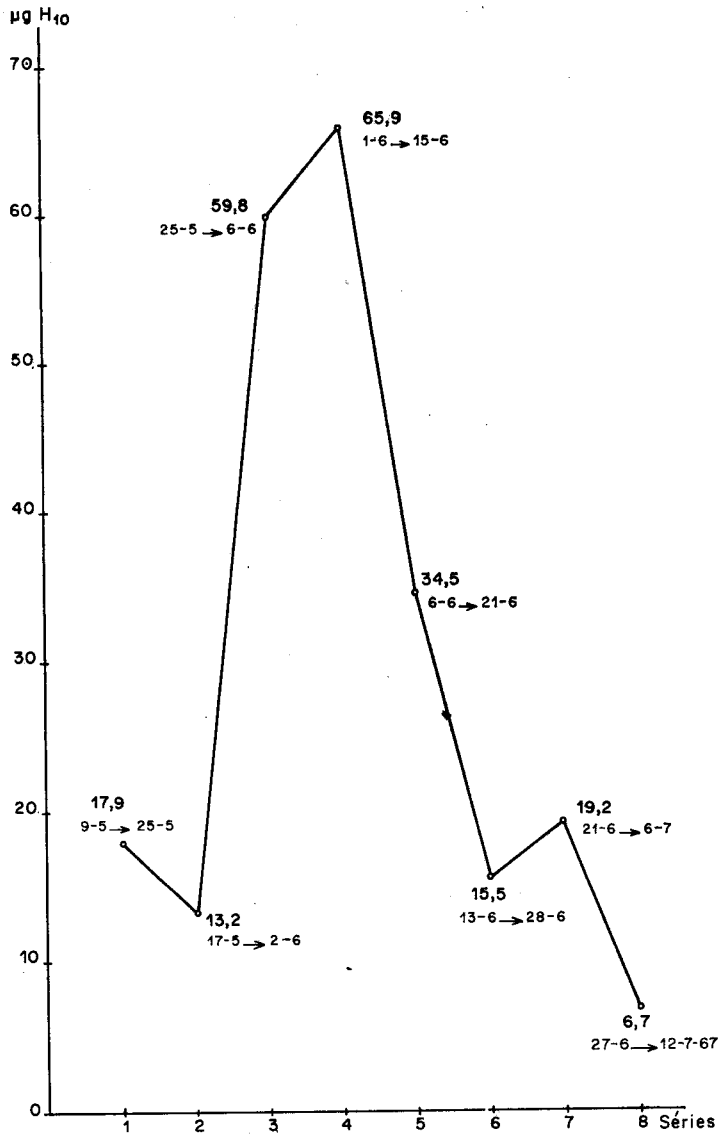

FIG. 2. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille)*

Pour les 8 séries, les ouvrières sont issues de ruches normales (fin du printemps et début de l'été 1967).

ABB. 2. — *Durchschnittliche Mengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene)*

Die Arbeiterinnen der 8 Serien entstammen normalen Bienenvölkern (Ende Frühjahr/Anfang Sommer 1967).

l'accroissement de la colonie et masquent en partie l'importance du couvain operculé. L'augmentation du nombre des nourrices doit alors produire son effet. Les jeunes ouvrières marquées, introduites parmi toutes les autres sont moins sollicitées que lorsqu'elles sont introduites dans une colonie moins populeuse. Lorsqu'elles sont prélevées vers le 16e jour, il est probable qu'elles ont déjà cessé leur activité de nourrices. Il ne faut pas oublier que pendant cette période (du 9 mai au 12 juillet) les larves se développent plus vite, les éclosions sont plus rapides et plus nombreuses et le renouvellement des nourrices par conséquent accéléré.

Au cours des séries précédentes (fig. 1), le renouvellement des nourrices était peu important. A l'époque de plein développement de la colonie, il fonctionne intensément. C'est, de plus, la période des grandes récoltes de pollen et de nectar; les ruches atteignent leur poids maximal, la population est également très forte. C'est à ce moment là aussi que se place l'essaimage.

3. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruches normales, introduites dans une autre ruche normale* (fin de la période d'été 1967)

Les expériences vont s'étaler maintenant du 23 août au 22 septembre 1967. Elles n'ont pas été poursuivies au-delà, suivant le protocole établi précédemment à cause des difficultés de prélever du couvain mûr dans les ruches extérieures, pour le marquage des jeunes ouvrières. Cinq séries ont été examinées. La figure 3 indique les quantités moyennes, exprimées en µg par abeille, d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues pour chacune d'elles.

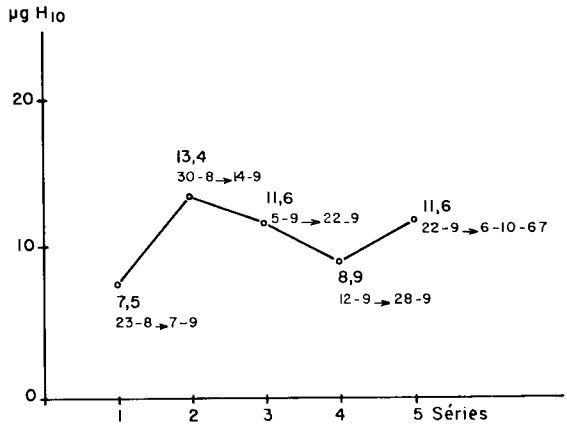

FIG. 3. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille)*

Pour les 5 séries, les ouvrières sont issues de ruches normales (fin de la période d'été 1967).

ABB. 3. — *Durchschnittsmengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene)*

Die Arbeiterinnen der 5 Serien wurden normalen Bienenvölkern entnommen (Ende des Sommers 1967).

On peut tout de suite constater que les quantités au cours de cette période sont toutes faibles puisqu'elles oscillent entre 7,5 µg et 13,4 µg d'acide par abeille.

Ici nous assistons au déclin progressif de la colonie receveuse. Nous passons de 4 à 5 cadres de couvain fin août, à 1 seul cadre à partir du début de septembre (série 3). Bien que la population soit encore importante, le couvain n'est plus homogène et en fin de compte, on trouve très peu de couvain operculé. La reine diminue nettement sa ponte. Malgré cela, il reste quand même des jeunes larves à nourrir. Les jeunes ouvrières marquées introduites dans la ruche receveuse sont bien les nourrices qui vont alimenter ces larves. A ce moment, la population a vieilli; il n'y a plus ou presque plus de renouvellement des nourrices.

Bien que l'activité d'élevage ait fortement diminué, la présence d'un peu de couvain ouvert suffit à appauvrir en acide hydroxy-10 décène-2 oïque les jeunes ouvrières marquées.

L'introduction de 1 000 jeunes ouvrières le 15 septembre (fig. 5, voir plus loin) a stimulé légèrement la reine. Nous avons constaté à nouveau l'apparition de quelques œufs et larves. Cette reprise de ponte s'est étalée sur les séries 4 et 5. Les faibles quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues dans ces séries nous paraissent encore indiquer l'influence du couvain ouvert sur les nourrices, même lorsque celui-ci est peu abondant.

4. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruchettes expérimentales contenant du couvain ouvert ou du couvain operculé*

Afin de vérifier nos observations concernant l'influence de l'état du couvain, influence remarquée surtout au cours de la période de début de développement de la colonie (fig. 1) et de fin de développement de celle-ci (fig. 3), nous avons pensé à modifier expérimentalement les conditions d'élevage.

Les expériences ont débuté en automne pour se poursuivre jusqu'au début de janvier. Elles ont eu lieu, à ce moment là, parce que le déroulement de nos recherches précédentes, les résultats obtenus et les hypothèses formulées, nous ont amenés tout naturellement à les réaliser à leur suite.

Pour cela, nous avons utilisé 2 ruchettes bicadres d'un modèle mis au point à Bures-sur-Yvette (DOUAULT, 1968). Dans celles-ci, nous avons successivement réalisé 3 expériences de même type, en contrôlant expérimentalement l'apparition de couvain ouvert ou de couvain operculé, au moment de l'introduction des ouvrières marquées. Ce couvain provenait de colonies placées dans une pièce chauffée à 20 °C. Le même matériel vivant a servi aux 3 expériences. Il s'agit de 2 à 3 000 ouvrières en provenance de 2 nucléi à 3 cadres avec reines italiennes de même origine, de même âge (moins de 1 an) fécondées à la même époque.

Les ouvrières avec leur reine ne seront introduites dans les ruchettes que lorsque celles-ci auront été au préalable garnies de cadres contenant du couvain ouvert ou du couvain operculé.

Les ruchettes sont installées dans une pièce chauffée entre 22 et 24 °C, mais elles peuvent communiquer avec l'extérieur par l'intermédiaire d'un tube de sortie.

Après ces préparatifs, le lendemain, nous introduisons, à l'intérieur de chaque ruchette, 100 à 150 ouvrières marquées de 1 à 2 jours (expériences 1 et 2), de 1, 2 et 3 jours (expérience 3). Elles seront ensuite prélevées entre le 19e et le 21e jour de leur vie.

Dans les expériences précédentes, elles étaient prélevées un peu plus tôt, vers le 16e jour afin de les trouver plus facilement dans la ruche expérimentale. Ici, elles le sont quelques jours plus tard, les ruchettes vitrées se prêtant plus facilement aux manipulations de prélèvement et la saison tardive ne favorisant pas les sorties des ouvrières. (BOCH et SHEARER indiquent d'ailleurs que vers 20 jours, les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque sont importantes). Nous avons utilisé le même nombre de lots que précédemment.

Dans le tableau 1, nous indiquons l'état du couvain au moment de l'introduction des jeunes ouvrières marquées, ainsi que la quantité moyenne d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque trouvée dans leur tête après un séjour d'une vingtaine de jours dans les ruchettes conditionnées.

Au cours de la première expérience, la ruchette A reçoit 2 cadres de couvain ouvert et la ruchette B 2 cadres de couvain operculé. Nous obtenons après dosages des extraits céphaliques, une moyenne de 4,3 μg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans la ruchette A contenant du couvain ouvert et une moyenne de 8,4 μg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans la ruchette B contenant du couvain operculé.

L'étude statistique des résultats comparés de A et de B donne une valeur de F très significative.

Au cours de la deuxième expérience, les 2 ruchettes A et B reçoivent 2 cadres vides dans lesquels les reines vont pondre. On aura donc dans chaque ruchette 2 cadres de couvain ouvert. Nous obtenons après dosages, une moyenne de 7,7 μg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans la ruchette A et une moyenne de 14,5 μg par abeille dans la ruchette B soit pour les 2 groupes une quantité moyenne égale à 11,1 μg par abeille.

Au cours de la troisième expérience, les 2 ruchettes A et B sont garnies chacune de 2 cadres de couvain operculé. Ils contiennent aussi quelques larves des 3e et 4e stades. Nous obtenons une moyenne de 27 μg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans la ruchette A et une moyenne de 24,6 μg par abeille dans la ruchette B soit pour les 2 groupes une quantité moyenne égale à 25,8 μg par abeille.

En fonction de l'état du couvain, nous avons comparé entre elles les expériences 2 et 3. La valeur de F reste très significative.

Ainsi, on peut se rendre compte que la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque trouvée dans les têtes d'ouvrières de même âge dépend bien de l'état de développement du couvain que ces ouvrières rencontrent dans la ruchette, au moment de leur introduction. Les ouvrières obligées d'alimenter les jeunes larves leur distribuent leur sécrétion chargée d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Leur tête indique une teneur faible en cet acide. Au contraire, en présence de couvain operculé, les ouvrières ne peuvent distribuer leur sécrétion. L'analyse chromatographique révèle une forte teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque.

Les chiffres obtenus chez les ouvrières mises en présence de couvain operculé sont plus faibles dans l'expérience 1 (ruchette B) que dans l'expérience 3 (ruchettes A et B). Nous voyons à cela plusieurs causes possibles : la population est plus stable et mieux acclimatée en fin d'expérience que lors de son démarrage;

TABLEAU 1
TABELLE 1

Réalisation des conditions d'élevage en rapport avec les dosages Aufzuchtsbedingungen im Zusammenhang m. d. Gewichtsbestimmungen	Expérience I 8.11.67 au 28.11.67 Versuch I v. 8.11.67 b. 28.11.67		Expérience II 30.11.67 au 18.12.67 Versuch II v. 30.11.67 b. 18.12.57		Expérience III 18.12.68 au 5.1.68 Versuch III v. 18.12.67 b. 5.1.68	
	Ruchette A Völkchen A	Ruchette B Völkchen B	Ruchette A Völkchen A	Ruchette B Völkchen B	Ruchette A Völkchen A	Ruchette B Völkchen B
État du couvain au moment de l'introduction des jeunes abeilles marquées. Brutstand beim Zusetzen der jungen, gezeichneten Bienen.	Couvain ouvert : œufs et jeunes larves (1er et 2e stades) Offene Brut : Eier, junge Maden (1. u. 2. Stad.)	Couvain operculé : nymphes Gedeckelte Brut : Puppen	Cadres vides, puis bonne ponte, œufs, larves en développement Leere Waben dann viele Eier, sich entw. Brut	Cadres vides, puis ponte moyenne, œufs, larves en développement Leere Waben dann mässig Eier, sich entw. Brut	Couvain operculé et larves des 3e et 4e stades Gedeckelte Brut, Maden 3. u. 4. Stad.	Couvain operculé et larves des 3e et 4e stades Gedeckelte Brut, Maden 3. u. 4. Stad.
Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque contenu dans une tête d'ouvrière (en μg). Durchschnittl. Gehalt an 10-Hydroxy-2-decensäure im Kopf einer Arbeiterin (in μg.)	4,3 ($n = 5$)	8,4 ($n = 5$)	7,7	14,5	27,0	24,6
			moyenne = 11,1 ($n = 10$)		moyenne = 25,8 ($n = 10$)	
Analyse statistique Statistische Analyse.	SX = 21,4	SX = 42,2	SX = 111,0		SX = 258,3	
Variations entre groupes Unterschiede zw. d. Gruppen.	43,2	Dl = 1	1085,0	Dl = 1		
Variation à l'intérieur des groupes Unterschiede innerhalb d. Gruppen.	28,8	Dl = 8	1171,1	Dl = 18		
Valeurs obtenues de F Werte v. F.	*12,0*		*16,7*			
Valeurs théoriques Theoret. Werte.	5,32 (0,05)	11 26 (0,01)	4,41 (0,05)			8,28 (0,01)

elle a bénéficié de l'apport de jeunes ouvrières naissantes en provenance du couvain operculé de l'expérience 1. Dans les ruchettes de l'expérience 3, le couvain operculé est né à partir du 27 décembre. Les éclosions étaient plus nombreuses et plus régulières que celles notées au cours de l'expérience 1. Lorsque la reine a pondu, nos ouvrières marquées ont été remplacées dans leur tâche de nourrices par ces abeilles plus jeunes. Nous trouvons là une indication concernant l'importance du renouvellement des nourrices. Celle-ci avait été suggérée au cours de la période de plein développement de la colonie (fig. 2).

5. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruches normales, introduites en une seule fois dans une autre ruche normale*

Nous avons modifié le protocole des expériences 2 et 3. Ainsi le 15 septembre 1967, nous avons marqué 1 000 ouvrières de 1 à 3 jours en provenance de couvain prélevé dans des ruches situées à l'extérieur. Elles ont été introduites en une seule fois. A partir de cette date, les ouvrières sont prélevées tous les 15 jours. Elles atteindront progressivement 34 à 141 jours de vie entre le 18 octobre 1967 et le 31 janvier 1968.

Huit séries ont été examinées. La figure 4 indique les quantités moyennes exprimées en μg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues pour chacune d'elles.

Cette courbe est en somme la continuation de la courbe 3. Les valeurs faibles observées à la fin de la période d'été sont encore enregistrées en automne dans les 2 premières séries le 18 et le 31 octobre. Les ouvrières ont à ce moment là 34-36 jours et 47-49 jours. Il y a encore dans la ruche expérimentale un peu de couvain ouvert sur 2 cadres. L'introduction de 1 000 jeunes ouvrières le 15 septembre a stimulé la reine. Sa ponte s'est étalée sur les séries 4 et 5 (fig. 3) et sur les séries 1 et 2 (fig. 4). La quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque reste faible, 8, 2 et 5,4 μg par abeille.

A partir de là, nous assistons à une augmentation progressive de la teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Dans les séries 3 à 7 la colonie s'organise pour l'hivernage. Les ouvrières ont dû consommer du pollen pour s'y préparer. Leurs glandes céphaliques vont progressivement se développer, comme l'indique MAURIZIO, 1954. Les ouvrières se groupent autour de leur reine. L'un de nous a montré (PAIN, 1961) qu'elle est très attractive pendant les mois d'hiver alors que l'activité des abeilles est réduite. Comme il n'y a plus d'élevage, les ouvrières conservent leur sécrétion. Ainsi, malgré l'âge avancé des ouvrières, du fait de l'absence du couvain ouvert, la teneur en acide est élevée. Nous supposons que l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque s'accumule lentement dans les têtes de ces ouvrières, plus particulièrement dans leurs glandes mandibulaires.

Cependant, il faut remarquer dans la série 5, une baisse dans la teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque : de 26,7 μg; nous enregistrons le 14 décembre : 12,9 μg soit une quantité deux fois plus faible.

Nous avons cherché la cause de cette diminution en supposant un réchauffement de la température extérieure susceptible de modifier le comportement de la reine.

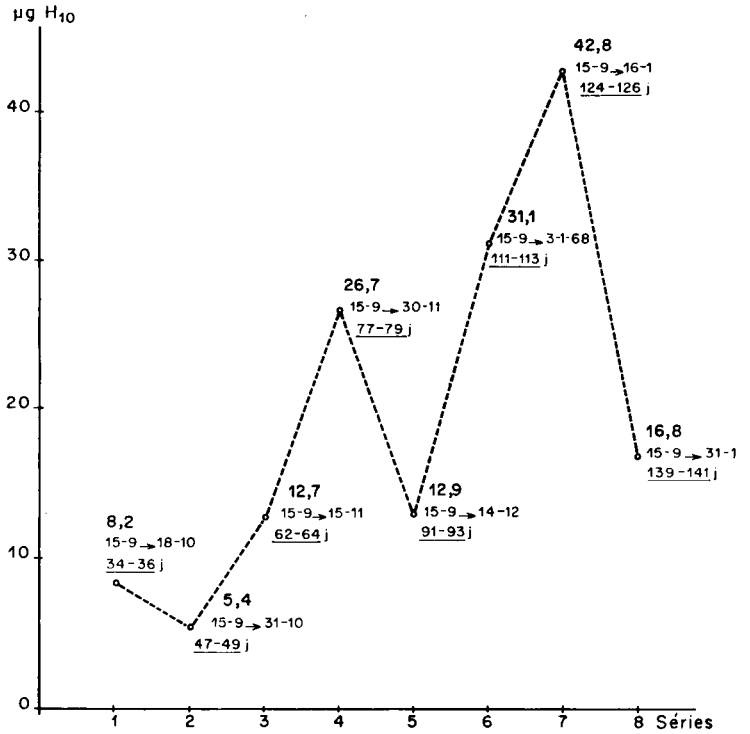

FIG. 4. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille)*

Pour les 8 séries, les ouvrières sont issues de ruches normales (introduites en une seule fois le 15 septembre 1967).

ABB. 4. — *Durchschnittsmengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene)*

Für die 8 Serien wurden die Arbeiterinnen normalen Völkern entnommen (am 15. September 1967 gleichzeitig zugesetzt).

Nous constatons effectivement que les températures minimales sont passées de — 1,6° le 13 à 4,1° le 14. Les températures maximales ont atteint 5,4° le 13, puis 7,3° le 14. Ce réchauffement a duré jusqu'au 17. Nous supposons qu'il a pu se produire une légère dissociation de la grappe hivernale. La reine a pu pondre quelques œufs qui nous ont échappé lors des visites rapides qui ont eu lieu à ce moment là. Ces œufs n'auraient pas évolué puisque nous n'avons pas observé la présence de larves.

Dans la série 8 du 31 janvier 1968, les ouvrières ont atteint 139-141 jours. D'ailleurs toute la population de la ruche receveuse a vieilli. On note, lors du prélèvement des ouvrières marquées, une reprise de ponte de la reine, la présence de larves et de quelques cellules operculées. La quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque diminue sans pour cela atteindre une valeur très faible : 16,8 µg. Nos ouvriè-

res marquées deviennent à nouveau des nourrices mais elles sont aidées par les autres ouvrières de la colonie qui ont le même âge. Il y a donc une certaine compétition entre les ouvrières âgées qui nourrissent. Sans doute est-ce pour cela que les valeurs obtenues ne sont pas plus faibles.

6. — *Dosages de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières issues de ruches chauffées, introduites dans une ruche normale* (hiver 1968)

Peu après avoir terminé les expériences avec les ruchettes préparées à recevoir couvain ouvert ou operculé, nous avons continué nos essais en reprenant le premier protocole. Il a été suivi du 22 janvier au 12 mars 1968. Les jeunes ouvrières marquées ne pouvaient provenir à ce moment-là que de couvain issu de ruches chauffées. Elles sont introduites après marquage dans la ruche receveuse. Nous nous sommes toujours servi de la même ruche située à l'extérieur. Le dernier prélèvement a été effectué le 28 mars 1968. Nous n'avons pas continué au-delà, nos premières expériences ayant débuté le 7 mars 1967. Huit séries ont été examinées. La figure 5 indique les quantités moyennes exprimées en µg par abeille d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues pour chacune d'elles.

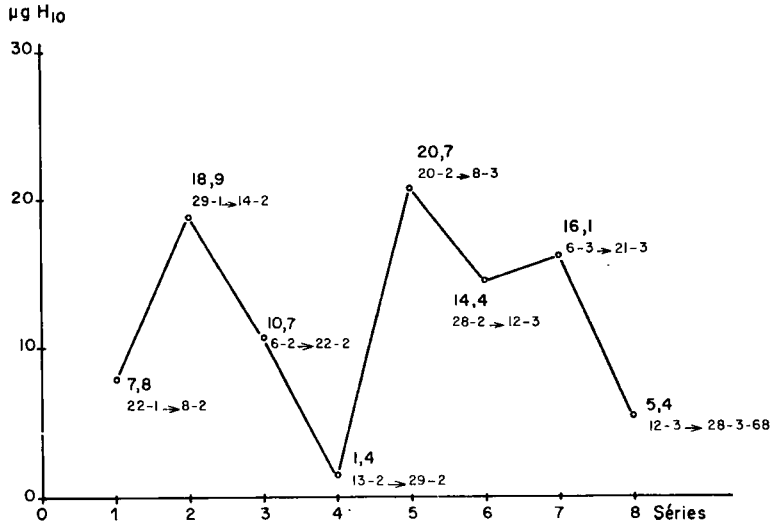

FIG. 5. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille)*

Pour les 8 séries, les ouvrières sont issues de ruches chauffées (hiver 1968).

ABB. 5. — *Durchschnittsmengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene)*

Die Arbeiterinnen der 8 Serien entstammen beheizten Bienenstöcken (Winter 1968).

La quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque présente des variations importantes. Elle passe par 3 minimums le 22 janvier, le 13 février et le 12 mars (séries 1, 4, 8). Nos observations indiquent que ces 3 points notés sur la courbe, correspondent à l'existence de 3 reprises de ponte. La colonie receveuse se trouve au tout début de son développement. Le 22 janvier, lors de l'introduction des ouvrières marquées, nous trouvons dans la ruche, des œufs et des jeunes larves, en faible proportion, répartis sur 3 cadres. La quantité d'acide enregistrée est faible, égale à 7,8 μg. Au cours de la deuxième série, le couvain ouvert a évolué. Il se transforme en couvain operculé. Bien qu'il y ait aussi présence d'œufs et de larves, la quantité d'acide remonte. Elle atteint 18,9 μg. Ensuite, cette quantité diminue dans la série 3, du fait que la reine a pondu quelques œufs qui ont éclos dans les cellules laissées vides par les ouvrières. On enregistre 10,7 μg d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Dans la série 4, on observe à nouveau une nette reprise de la ponte. La colonie se développe, le nombre de cadres avec couvain ouvert augmente (jusqu'à 3 et 4). La quantité d'acide est très faible, égale à 1,4 μg. Au cours des séries suivantes 5, 6 et 7 du 20, 28 février et du 6 mars, si nous observons bien la présence de larves dans les cellules, celles-ci n'évoluent pas. On ne trouve pas ou presque pas de couvain operculé. On constate en même temps une diminution de la surface totale du couvain parce qu'à cette période de l'année, il n'y a pas encore apport de pollen. Nos ouvrières marquées nourrissent probablement assez mal ces larves. C'est pourquoi les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque sont égales à 20,7, 14,4 et 16,1 μg. D'ailleurs ce processus paraît être normal dans notre région, où l'on observe souvent un premier démarrage de la ponte vers la mi-janvier, puis un deuxième un peu plus tard en février, mais les larves mal alimentées disparaissent.

Il faut attendre le début de mars pour noter à nouveau une troisième reprise de la ponte. Dans la série 8, nous notons uniquement la présence d'œufs et de larves. La quantité d'acide est faible, égale à 5,4 μg. Elle recoupe les valeurs obtenues des deux premières séries de la figure 1. La figure 5 reflète à notre avis l'existence d'un rythme de sécrétion lié au rythme de la reprise de ponte de la reine et à l'évolution de son couvain. La présence d'un tel rythme a été signalée au début de ce travail (fig. 1). Dans ces deux cas, la colonie receveuse en est à son début de développement. De ce fait, il est plus facile de le mettre en évidence que lorsque la colonie est très forte. Dans l'ensemble, le couvain operculé est peu abondant. Il n'y a pas ou presque pas de renouvellement des nourrices. Les ouvrières marquées sont bien celles qui nourrissent les larves mais elles sont peut-être aidées dans leur tâche par les ouvrières plus âgées de la colonie expérimentale, tout au moins pour les premières séries.

Pour la série 5, où la quantité d'acide est la plus élevée, nous pensons qu'il y a eu un renouvellement partiel des nourrices. Les ouvrières marquées introduites le 20 février ont reçu l'aide des nourrices écloses précédemment (série 2), également celle des jeunes ouvrières introduites chaque semaine soit un total de 900 jeunes abeilles. De plus, à cette époque de l'année, les ouvrières âgées fonctionnent encore comme nourrices. Parmi celles-ci, il ne faut pas oublier qu'il y a les 1 000 ouvrières de 1 à 3 jours introduites le 15 septembre qui sont venues renforcer la colonie expérimentale. La dernière valeur obtenue (série 8) recoupe parfaitement les chiffres enregistrés au début de la première expérience.

Le tableau 2 et la figure 6 récapitulent l'ensemble de nos expériences.

TABLEAU 2 récapitulatif

TABELLE 2 kurz zusammengefasst

Dates d'introduction des abeilles marquées Datum d. Zusetzens d. gezeichneten Bienen von bis	Dates de prélèvement des abeilles marquées Datum d. Entnahme. d. gezeichneten Bienen von bis	Origine du couvain Herkunft d. Brut	Emplacement de la ruche receveuse Standort des Aufnahmevolkes	Âge des abeilles lors de leur prélèvement Alter d. Bienen b. Entnahme in Tagen	Nombre de séries analysées Zahl d. analysierten Serien
	Du 7/ 2 au 8/ 3/67	Rucher extérieur		Âge indéterminé	4
Du 7/ 2 au 22/ 2/67 ..	Du 22/ 2 au 8/ 3/67	Ruches chauffées	Rucher chauffé	16 ± 2 jours	3
Du 7/ 3 au 3/ 5/67 ..	Du 22/ 3 au 18/ 5/67	Ruches chauffées	Ruche extérieure	16 ± 2 jours	9
Du 9/ 5 au 27/ 6/67 ..	Du 25/ 5 au 12/ 7/67	Ruches extérieures	Ruche extérieure	16 ± 2 jours	8
Du 23/ 8 au 22/ 9/67 ..	Du 7/ 9 au 6/10/67	Ruches extérieures	Ruche extérieure	16 ± 2 jours	5
Du 8/11 au 18/12/67 ..	Du 28/11 au 5/ 1/68	Ruches chauffées	Ruchettes chauffées	20 ± 1 jour	3
Le 5/9/1967.....	Tous les 15 jours	Ruches extérieures	Ruche extérieure	De 34 à 141 jours	8
Du 22/ 1 au 12/ 3/68 ..	Du 8/ 2 au 28/ 3/68	Ruches chauffées	Ruche extérieure	16 ± 2 jours	8

Erläuterungen zu Tabelle 2 :

Âge indéterminé = unbestimmten Alters. Rucher extérieur = Aussenstand Ruche chauffée = beheizter Bienenstock

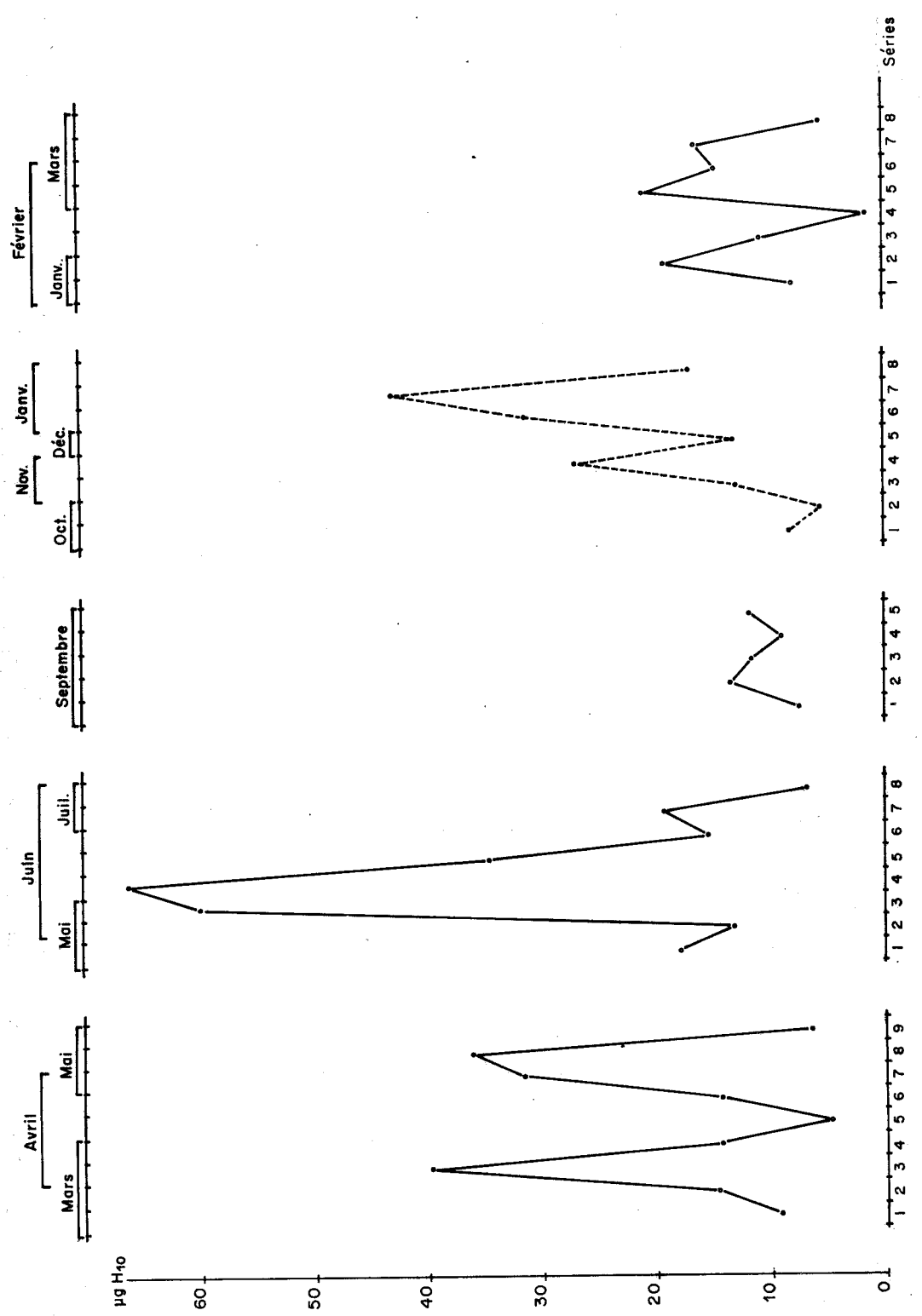

FIG. 6. — *Quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues par série (en µg par abeille) au cours de toutes les périodes considérées depuis la fin de l'hiver 1967 jusqu'à la fin de l'hiver 1968.*

ABB. 6. — *Durchschnittsmengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Serie (in µg je Biene) während aller beobachteten Zeiträume von Winterausgang 1967 bis zum Ende des Winters 1968.*

7. — *Évaluation mensuelle de la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque*

Nous avons jugé intéressant d'évaluer mensuellement les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Nous avons donc groupé nos résultats en tenant compte uniquement des dates d'introduction et de prélèvement des ouvrières, effectuées sur un mois. De ce fait, nous obtenons selon ces dates un nombre variable de séries avec les chiffres moyens que nous indiquons ci-dessous :

TABLEAU 3

TABELLE 3

Mois Monat	Nombre de séries Zahl der Serien	Dates Versuchsdaten	Moyennes mensuelles Monatliche Mittelwerte
Mars	4	du 7/ 3 au 13/ 4	19,6
Avril	6	du 21/ 3 au 9/ 5	23,5
Mai	6	du 18/ 4 an 6/ 6	27,5
Juin	7	du 17/ 5 au 12/ 7	30,7
Juillet	2	du 21/ 6 au 12/ 7	12,9
Août	2	du 23/ 8 au 14/ 9	10,4
Septembre	5	du 23/ 8 au 6/10	10,6
Octobre	2	du 18/10 an 31/10	6,8
Novembre	2	du 15/11 au 30/11	19,7
Décembre	2	du 14/12 au 3/ 1/68	22,0
Janvier	2	du 16/ 1 au 31/ 1/68	29,8
Janvier	2	du 22/ 1 au 14/ 2	13,3
Février	6	du 22/ 1 au 12/ 3	12,3
Mars	4	du 20/ 2 au 28/ 3	14,1

Pour les chiffres mensuels donnés d'octobre à janvier, il s'agit des ouvrières introduites le 15 septembre. Elles ont été prélevées par la suite tous les 15 jours.

Nous avons porté sur la figure 7 toutes les moyennes mensuelles ainsi obtenues.

La figure 7 fait mieux apparaître ce que nous avons déjà expliqué en analysant séparément les courbes. La quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque s'élève progressivement à partir du mois de mars pour atteindre sa valeur la plus élevée en juin avec 30,7 µg d'acide par abeille. La colonie est au maximum de son développement. Elle possède du couvain à tous les stades mais les nourrices sont très vite renouvelées. Puis à partir de cette date, les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque diminuent jusqu'en octobre en même temps que la colonie décline. De plus, les nourrices ne sont pratiquement plus renouvelées. A ce moment-là, nous avons été amenés à modifier le protocole d'expérience afin de pouvoir poursuivre nos prélèvements. Les jeunes ouvrières introduites en septembre vieillissent progressivement d'octobre à janvier. Malgré cela, la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque augmente régulièrement dans leur tête, du fait qu'il n'y a plus d'élevage. Tout se passe comme si elles se préparaient à faire face aux demandes du prochain couvain. En janvier, nous avons repris le protocole habituel. Les quantités

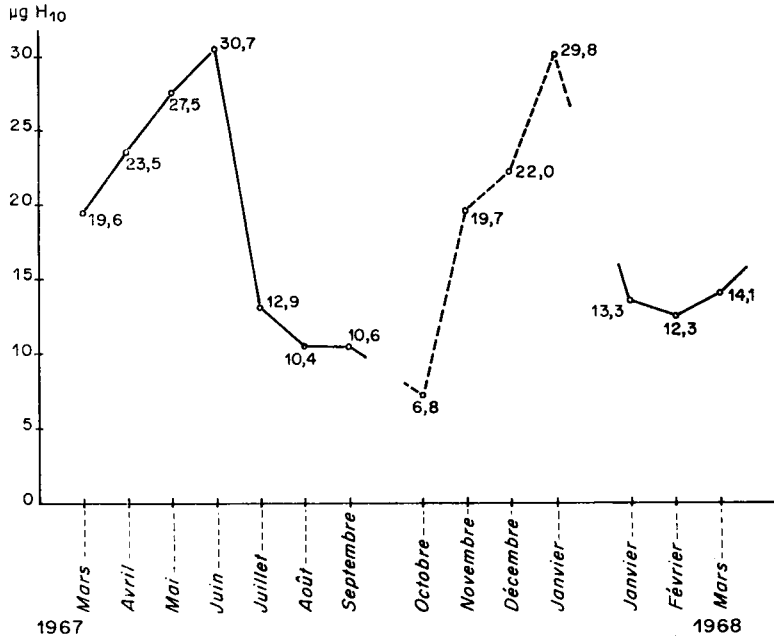

FIG. 7. — *Évaluation mensuelle des quantités moyennes d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque*

ABB. 7. — *Durchschnittliche Mengen an 10-Hydroxy-2-decensäure je Monat*

d'acide ont diminué. Elles sont en rapport avec plusieurs reprises de ponte. Cependant ces quantités ne sont pas aussi faibles qu'à la fin de la saison apicole (en août et septembre) du fait que la population n'est plus dans le même état. Il existe une certaine compétition entre nos ouvrières marquées et les ouvrières de la colonie dont certaines peuvent encore fonctionner comme nourrices.

En mars 1968, nous obtenons une moyenne mensuelle de 14 µg qui est un peu inférieure à celle de mars 1967, égale à 19,6 µg. Nous considérons que ces 2 valeurs finalement se recoupent et qu'à partir de mars on doit s'attendre à ce que les valeurs remontent. Il y a bien sûr, d'une année sur l'autre des variations mineures. Nous pensons cependant avoir dégagé un schéma général de ces variations, tout au moins dans la ruche expérimentale considérée.

DISCUSSION

Tout d'abord, nous comparerons nos résultats avec ceux de BOCH et SHEARER (1967). Pour ces auteurs, la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque par abeille varie de 0 à 60 µg entre le 16 juin et le 20 juillet. La quantité la plus forte est obtenue pour des ouvrières de 24 jours capturées entre le 23 et le 29 juin. Au cours de nos expériences, la quantité d'acide varie chez des ouvrières de 16 ± 2 jours de 1,4 µg, lors du prélèvement du 29 février à 65,9 µg pour celui du 15 juin. Dans les 2 cas,

nous constatons que la valeur maximale est du même ordre. De plus, elles ont été enregistrées à la même période, à partir de la mi-juin pour nous, une semaine plus tard pour les auteurs canadiens.

Cependant si nous poursuivons plus avant la comparaison, elle s'avère plus délicate étant donné que les expériences n'ont pas été menées tout à fait de la même façon, les buts à atteindre étant différents ainsi que les conditions climatiques des deux pays. D'autre part, 2 années d'intervalle les séparent. Nous avons utilisé des abeilles de race italienne, les auteurs canadiens ne signalent pas, à notre connaissance la race utilisée. Enfin, nous avons prélevé les ouvrières marquées à l'intérieur de la ruche receveuse en nous intéressant au développement de la colonie et à l'évolution de son couvain. BOCH et SHEARER ont plutôt insisté sur l'activité des ouvrières en notant leur transformation en nourrices, gardiennes ou butineuses. Les dosages de ces auteurs s'étalent du 16 juin au 20 juillet 1965 alors que les nôtres ont été répartis au cours de toute une année. Nous ne pourrons donc établir une comparaison que sur une courte période d'un peu plus d'un mois. Analysant les chiffres de BOCH et SHEARER, nous désirons simplement en tirer un schéma général d'évolution de la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque susceptible de permettre une discussion. Ainsi, nos ouvrières étant âgées de 16 $\pm$ 2 jours et au nombre de 50, nous n'avons tenu compte des quantités indiquées par les auteurs canadiens que pour des ouvrières de même âge, c'est-à-dire de 14 à 18 jours, ce qui d'ailleurs permet d'obtenir à peu près le même nombre d'ouvrières. Ainsi pour les auteurs canadiens, nous avons calculé les moyennes suivantes :

du 16 au 22 juin : de 16 à 17 µg d'acide;
du 23 au 29 juin : 32,5 µg d'acide;
du 30 au 6 juillet : 22,5 µg d'acide;
du 7 au 13 juillet : 17,3 µg d'acide;
du 14 au 20 juillet : 20 µg d'acide.

Si nous comparons ces chiffres avec ceux que nous avons enregistrés sur la figure 7 où figurent les moyennes mensuelles, nous trouvons qu'ils sont comparables du fait que les quantités d'acide évoluent dans le même sens. Ceux de BOCH et SHEARER passent par un maximum de 32,5 µg fin juin. A la même époque, notre moyenne atteint 30,7 µg pour le mois de juin (fig. 7).

En juillet, les quantités d'acide diminuent dans les 2 types d'expériences. Pour nous, elles sont de l'ordre de 13 µg. Pour BOCH et SHEARER, elles sont un peu plus fortes. Elles oscillent entre 17 et 22 µg si l'on considère la période du début de juillet jusqu'au 20 du même mois. Nous ne pensons pas qu'on puisse détailler davantage cette comparaison. Cependant, nous relevons une observation de BOCH et SHEARER mais à propos de l'heptanone-2 qui suscite particulièrement notre intérêt puisqu'il s'agit de dosages effectués en octobre et en novembre 1964. Ils constatent chez des butineuses d'âge inconnu une diminution importante de cette subtance par rapport à la période d'été. De notre côté, nous avons aussi remarqué au cours de la période allant du 7 septembre au 6 octobre (fig. 3) et du 18 au 31 octobre (fig. 4) un phénomène identique à propos de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Nous pensons trouver une explication à cette diminution du taux de la sécrétion dans le travail de JUNG-HOFFMANN (1966, p. 309, courbe 7 et p. 316). En effet, cet auteur dit avoir observé lors de l'examen des nourritures larvaires

déposées par les nourrices, que l'aliment blanc est distribué en plus grande quantité en automne qu'en été. Le pourcentage de cet aliment pour des larves de 1 jour se monte à 25 %, pour des larves de 2 jours à 39 %. En été, il est de 20 % et de 27 % pour les larves de 1 et de 2 jours. Par conséquent, si pendant cette période, les larves sont mieux nourries, les quantités d'acide trouvées dans les têtes de nos ouvrières doivent être faibles. C'est ce que nous obtenons. Rappelons qu'à ce moment-là, il y a dans la colonie des réserves de pollen stocké en bon état de fermentation (PAIN, MAUGENET, 1966). Les nourrices ont donc à leur disposition une nourriture azotée appropriée. L'aliment blanc selon JUNG-HOFFMANN est une production des glandes hypopharyngiennes et mandibulaires. Or, l'on sait que ces glandes se développent à des degrés divers selon l'activité d'élevage du couvain. De ce point de vue, ce sont surtout les glandes hypopharyngiennes qui ont été examinées. Plusieurs auteurs ont montré que les glandes hypopharyngiennes sont développées dans une colonie qui ne possède que peu ou pas de couvain (ROSCH, 1925; MAURIZIO, 1950-1954; MOSKOVLJEVIC-FILIPOVIC, 1952, 1956; DREISCHER, 1956). A cet égard, la courbe du développement de ces glandes donnée par MAURIZIO (1954, p. 169) nous frappe en raison de son aspect semblable à notre courbe 2. Dans la colonie qu'elle a observée pendant les mois d'été, où par conséquent se trouve du couvain, les glandes se développent chez les ouvrières jusqu'à l'âge d'environ 18 jours. A ce moment-là, leur développement est maximal. Ensuite, elles décroissent progressivement. Nous observons aussi pour nos ouvrières marquées du même âge que la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque passe également par un maximum au cours de l'été.

En hiver, bien que les ouvrières soient plus âgées, on en trouve beaucoup dont les glandes hypopharyngiennes sont développées (EVENIUS, 1937; KRATKY, 1931; LOTMAR, 1939; MAURIZIO, 1954; SOUDEK, 1927).

Les résultats que nous avons portés sur la courbe 4 montrent une augmentation du taux de la sécrétion du fait que les ouvrières ne nourrissent plus. Elles se préparent à alimenter le couvain de printemps. Les résultats de nos dosages concordent avec les données de ces auteurs.

Le rythme du développement des glandes mandibulaires en relation avec le couvain a été abordé par HANSER et REMBOLD (1964). Ces auteurs signalent en juin (p. 940) une augmentation importante de la teneur en bioptérine et en acide pantothénique dans les glandes mandibulaires d'ouvrières maintenues en étuve pendant 4 jours sans reine et sans couvain. Les valeurs obtenues sont dix fois supérieures à celles enregistrées dans les glandes mandibulaires d'ouvrières issues de ruches normales. D'autre part, ils remarquent, à la même époque dans les glandes mandibulaires d'abeilles de 11 jours, d'une population qui élève des larves de reines, une augmentation de la teneur en ces deux substances. Cette augmentation est encore plus forte, si la même population d'élevage ne renferme que des cellules royales fermées. Bien qu'il ne s'agisse pas des mêmes substances, elles sont produites dans les mêmes glandes. C'est pourquoi, la comparaison nous apparaît possible. Encore une fois, dans ces deux types d'expériences, les valeurs obtenues sont toujours plus élevées lorsqu'il n'y a pas de couvain, que ce soit dans les expériences en étuve, ou lorsqu'il n'y a que des cellules royales operculées. L'augmentation des valeurs en bioptérine et en acide pantothénique apparaissant lorsqu'il y a des cellules royales ouvertes, peut s'expliquer par le fait qu'il y a à ce moment là un surcroît d'ouvrières qui nourrissent les larves. Les glandes des nour-

rices sont probablement en état permanent d'activation. Quand les cellules royales sont operculées, cet état persiste et les valeurs enregistrées sont encore plus élevées. Au cours de nos expériences, à l'époque de l'essaimage (courbe 2) la ruche receveuse n'a jamais contenu de cellules royales. C'est pourquoi, nous n'avons pas encore envisagé les effets de l'élevage de reine sur la teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Nous pouvons simplement constater qu'à l'époque de l'essaimage, qui se place à Bures au mois de juin, les valeurs en acide sont les plus élevées. Notre intention est d'en rechercher les raisons en relation avec ce problème.

CONCLUSION

Dans une note précédente (PAIN, BARBIER, ROGER, 1967) nous avions indiqué les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque obtenues dans les têtes d'ouvrières prises individuellement. A ce propos, nous avions fait la remarque de l'existence de variations quantitatives dues à la répétition des essais au long d'une année apicole. L'analyse des résultats des dosages par chromatographie gaz-liquide effectués sur plus d'un an nous permettent de dégager l'influence de deux phénomènes primordiaux agissant sur la production de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Nous avons montré d'abord le rôle du couvain, ensuite celui du renouvellement des nourrices. Ces deux processus interviennent de façon plus ou moins intense à des périodes différentes en fonction de l'état de développement de la colonie.

En premier lieu, l'influence du couvain est primordiale et intervient tout au long de l'année. Mais celle-ci est particulièrement sensible au cours de trois périodes : lorsque la colonie est en voie de développement (période de la fin de l'hiver et du printemps), lorsqu'elle est sur le déclin (période de la fin de l'été), lorsqu'elle est en état d'hivernage. Les courbes 1, 3, 4 et 5 sont très représentatives à cet égard. Les valeurs faibles en acide correspondent à la présence de couvain ouvert, les valeurs élevées à celle de couvain operculé ou à l'absence de tout couvain, en hiver. Ces observations ont été vérifiées statistiquement en créant en ruchettes les conditions désirées d'élevage avant l'introduction des ouvrières marquées. Cette influence du couvain est d'ailleurs à rapprocher de celle observée par SIMPSON, RIEDEL et WILDING (1968) concernant la production d'invertase par les glandes hypopharyngiennes d'ouvrières âgées de 14 jours. Tout comme l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, cet enzyme est d'autant plus abondant que les ouvrières ont moins de couvain à nourrir.

En second lieu, l'importance du renouvellement des nourrices est particulièrement nette à l'époque du plein développement de la colonie (courbe 2). A cette époque, le rôle du couvain est en partie masqué. Les nourrices sont plus nombreuses pour faire face aux besoins alimentaires des larves. Elles sont aussi plus vite remplacées. De ce fait, même en présence de couvain ouvert, elles sont moins vite épuisées. Cependant, à l'époque du plein été, d'autres facteurs doivent intervenir de façon plus ou moins importante dans le cycle de formation de cet acide. Ces facteurs sont liés à l'évolution de la colonie, à la présence de pollen en quantité appréciable, à la période d'essaimage, à la formation de cellules royales.

La comparaison de notre travail avec celui de BOCH et SHEARER montre qu'il existe une certaine concordance quant à l'évolution des quantités d'acide obtenues

sur un peu plus d'un mois. Les valeurs maximales sont aussi du même ordre et apparaissent au cours du mois de juin. Nos résultats confirment d'autre part les données des auteurs qui ont étudié le rythme du développement des glandes céphaliques en relation avec le couvain. Nous apportons donc ici une preuve supplémentaire d'ordre biochimique, tout au moins pour l'une des substances contenues dans la tête des ouvrières. Le cycle d'apparition de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque est d'autant plus intéressant à mettre en évidence qu'il est considéré comme l'acide le plus abondant de la gelée royale.

Nous avons l'intention, par la suite, de nous attacher plus particulièrement à certains aspects de l'évolution de la colonie autre que la présence de couvain et le renouvellement des nourrices.

Reçu pour publication en septembre 1969.

Eingegangen im September 1969.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Monsieur M. BARBIER, Maître de recherches (Institut de chimie des substances naturelles, 91–Gif-sur-Yvette), qui a bien voulu nous permettre d'utiliser l'appareil PYE de chromatographie en phase gazeuse.

Grâce à son obligeance, à ses conseils judicieux et à un intérêt toujours soutenu, nous avons pu, dans son laboratoire, continuer les recherches entreprises depuis plusieurs années.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem Vorkommen von 10-Hydroxy-2-decensäure in den Köpfen von Arbeiterinnen bekannten Alters. Angeregt hierzu wurden die Verfasser durch bereits vorliegende und veröffentlichte Ergebnisse in dieser Frage (BARBIER, PAIN, 1960; PAIN, 1961; PAIN et al., 1962; PAIN *et al.*, 1967). Es stellte sich tatsächlich die Frage, ob es nicht einen jahreszeitlichen Zyklus in der Bildung von 10-Hydroxy-2-decensäure gibt, so wie er bei anderen Substanzen bekannt ist (Biopterin, 2-Heptanon).

Das lebende Material, schlüpfende Brut, wurde wöchentlich entnommen und zwar entweder Völkern, die im Freien standen oder beheizten Bienenstöcken. Die jungen gezeichneten Arbeiterinnen wurden stets dem gleichen, im Freien stehenden Bienevolk zugesetzt.

Die Gewichtsbestimmungen wurden an 16 ± 2-tägigen Arbeiterinnen durchgeführt. Wöchentlich wurden 50 Bienen in Gruppen zu 10 entnommen.

Zur Extraktion der 10-Hydroxy-2-decensäure wurden die Arbeiterinnenköpfe in Äther zerquetscht und die Extrakte nach dem Filtrieren und der Konzentration sehr rasch, in Anwesenheit von Diazomethan, methyliert. Vor der Injektion in den Gaschromatographen wurden sie erneut in Äther aufgenommen.

Die quantitative Bestimmung der Kopfextrakte erhält man durch Vergleichen der Flächeninhalte der registrierten Peaks mit denen der Proben von Methylestern künstlicher 10-Hydroxy-2-decensäure. Die Ergebnisse sind in μg pro Biene angegeben.

Der 10-Hydroxy-2-decensäure-Gehalt wurde zu verschiedenen Zeiten bestimmt :

1. Gegen Ende des Winters und im Frühjahr 1967. Die Bienen stammten aus beheizten Stöcken (Abb. 1).

2. Gegen Frühjahrsende und zu Beginn des Sommers. Die Bienen stammten aus normalen Stöcken (Abb. 2).

3. Am Ende des Sommers. Die Arbeiterinnen stammten aus normalen Völkern (Abb. 3).

4. Vom Herbst 1967 bis Anfang Januar 1968. Die Arbeiterinnen wurden Versuchsvölkchen entnommen (Tab. 1).

5. Von Mitte September bis Ende Januar. Die Arbeiterinnen entstammten normalen Völkern. Sie wurden alle gleichzeitig und zwar im September dem für die Aufnahme bestimmten Volk zugesetzt und dann alle 14 Tage entnommen (Abb. 4).

6. Am Ende des Winters 1968. Die Arbeiterinnen wurden beheizten Völkern entnommen (Abb. 5).

Durch Zusammenfassen unserer Einzelergebnisse haben wir die 10-Hydroxy-2-decensäure-Mengen monatlich berechnet und daraus ein allgemeines Schema der quantitativen Veränderungen abgeleitet (Abb. 7).

Unsere Ergebnisse werden mit denen von Boch und Shearer (1967) verglichen. Es stellte sich heraus, dass der Vergleich nur während einer kurzen Periode möglich ist. Wir konnten feststellen, dass die Maximalwerte von der gleichen Grössenordnung sind : Sie erreichen bei uns im Juni 65,9 µg, während die kanadischen Autoren im gleichen Monat 60 µg registrierten. Ausserdem verläuft die Entwicklung der durchschnittlichen Säuremengen gleichsinnig. Sie erreichen ihr Maximum im Juni, um dann abzufallen. Diese Abnahme erklären wir, indem wir uns auf die Arbeit von Jung-Hoffmann (1966) beziehen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Bestimmungen über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr erlauben uns, auf den Einfluss zweier wichtiger Faktoren auf die Bildung der 10-Hydroxy-2-decensäure hinzuweisen :

1. Die Brut spielt eine wichtige Rolle am Anfang und am Ende der Volksentwicklung (Abb. 1 u. 3) sowie während der Uberwinterung (Abb. 4 u. 5). Ihre Bedeutung wurde durch Versuche in Beobachtungsvölkchen statistisch belegt (Tab. 1).

Ist offene Brut vorhanden, verteilen die Arbeiterinnen ihr an Hydroxydecensäure reiches Sekret an die jungen Larven; ihre Köpfe enthalten dann nur wenig von dieser Säure. Bei gedeckelter oder fehlender Brut ist der Gehalt an 10-Hydroxy-2-decensäure in den Köpfen der Arbeiterinnen höher.

2. Der Ersatz der Ammenbienen während der Zeit stärkster Entwicklung eines Bienenvolkes spielt eine ganz entscheidende Rolle (Abb. 2). Sie verdeckt teilweise die Rolle der Brut. Wir sind der Ansicht, dass noch andere Faktoren den Zyklus der Säurebildung beeinflussen. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die Angaben der Autoren, die den Entwicklungsrhythmus der Kopfdrüsen der Arbeiterinnen in Beziehung zur Brut untersucht haben.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbot O.D., French R.B. Chemical composition and physiological properties of royal jelly. *Ann. Rept. Florida. Agr. Exp. Sta.*, 69.

Barbier M., Pain J., 1960. Étude de la sécrétion des glandes mandibulaires des reines et des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifica*) par chromatographie en phase gazeuse. *C.R. Acad. Sci., Fr, 250,* 3740-3742.

Barker S.A., Foster A.B., Lamb D.C., Hodgson N., 1959. Identification of 10-hydroxy-Δ^2-decenoic acid in Royal Jelly. *Nature, G.B, 183,* 996-997.

BARKER S.A., FOSTER A.B., LAMB D.C., JACKMAN L.M., 1959. Biological Origin and configuration of 10-hydroxy- Δ^2-decenoic acid. *Nature, G.B, 184,* 634.

BOCH R., SHEARER D.A., 1967. 2-Heptanone and 10-Hydroxy-*Trans*-Dec-2-Enoic Acid in the Mandibular Glands of Worker Honey Bees of Different ages. *Z. vergleich. Physiol., Dtsch, 54,* 1-11.

BROWN W.H., FELAUER E.E., 1961. A new Fatty Acid from Royal Jelly. *Nature, G.B, 190,* 88.

BROWN W.H., FREURE R.J., 1959. Some Carboxylic Acids present in Royal Jelly. *Canad. J. Chem., 37,* 2042-2046.

BUTENANDT A., REMBOLD H., 1957. Über den Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene. I. Isolierung, Konstitutionsermittlung und Vorkommen der 10-Hydroxy- Δ^2-decensäure. *Z. (Hoppe Seyler's) physiol. Chem., Dtsch., 308,* 284-289.

CALLOW R.K., JOHNSTON N.C., SIMPSON J., 1959. 10-Hydroxy- Δ^2-decenoic Acid in the Honeybee (*Apis mellifera*). *Experientia, Suisse, 15* (11), 421.

CALLOW R.K., CHAPMAN J,R., PATON P.N., 1964. Pheromones of the Honeybee : Chemical Studies of the Mandibular Gland Secretion of the Queen. *J. Apicultural Res., 3* (2), 77-89.

DOUAULT Ph., 1968. Description et utilisation de deux types de ruchettes expérimentales monocadres et bicadres. *Ann. Abeille, Fr, 11* (1), 63-67.

DREISCHER H., 1956. Untersuchungen uber die Arbeitstätigkeit und Drüsenentwicklung altersbestimmter Bienen im weisellosen Volk. *Zool. Jb., Abt. allg. Zool. Physiol. Tiere, Dtsch, 66* (2/3), 429-472.

EVENIUS C., 1937. Beobachtungen an der Schlunddrüse der Honigbiene während der Winterruhe. *Dtsch. Imkerführer, 11* (5), 128-133.

HANSER G., REMBOLD H., 1960. Über den Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene. IV. Jahreszeitliche Veränderungen im Biopteringehalt des Arbeiterinnen futtersaftes. *Z. (Hoppe-Seyler's) physiol. Chem., Dtsch, 319,* 200-205.

HANSER G., REMBOLD H., 1964. Analytische und histologische Untersuchungen der Kopf und Thoraxdrüsen bei der Honigbiene *Apis mellifica. Z. Naturforsch., B, Dtsch, 19* (10), 938-943.

JUNG-HOFFMANN I., 1966. Ein Vergleich der Brutpflegemassnahmen und der Herkunft der Futterkomponenten. *Z. Bienenforsch., 8* (9), 296-321.

KRATKY E., 1931. Morphologie und Physiologie der Drüsen in Kopf und Thorax der Honigbiene (*Apis mellifica L.*) *Z. Wissensch. Zool., A, Dtsch, 139* (1), 120-200.

LOTMAR R., 1939. Der Eiweiss-Stoffwechsel im Bienenvolk (*Apis mellifica*) während der Überwinterung, *Landw. Jb. Schweiz, 53,* 34-70.

MACK H., 1959. Verfahren zur Gewinnung von 10-Oxy- Δ^2-decensaüre aus Bienenfuttersäften, *Dtsch. Patent,* n° 1052 398, 1 p.

MAURIZIO A., 1950. Untersuchungen über den Einfluss der Pollennahrung auf Brutpflege, Lebensdauer und physiologischen Zustand der Bienen. *Schweiz. Bienenztg., 73,* 58-64.

MAURIZIO A., 1954. Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene (*Apis mellifica L.*). *Landw. Jb. Schweiz, 68* (2), 115-182.

MOSKOVLJEVIC-FILIPOVIC V., 1952. Le développement des glandes pharyngiennes chez les abeilles ne s'occupant pas dans les conditions expérimentales de l'élevage des larves. (En serbe - résumé anglais). *Zborn, Rad. Inst. Fiziol. Razv. Genet. Selek* (2), 147-150.

MOSKOVLJEVIC-FILIPOVIC V., 1956. L'influence des structures sociales modifiant le développement des glandes pharyngiennes et le travail de l'abeille (*Apis mellifica L.*). (En serbe - résumé anglais). *Srpska Akad, Nauka, 262* (14), 1-101.

PAIN J., 1955. Dosage biologique et spectrographie de l'ectohormone des reines d'abeilles. *C.R. Acad. Scie, Fr, 240,* 670-672.

PAIN J., 1961. Sur la phérormone des reines d'abeilles et ses effets physiologiques. *Thèse fac. Sci. Paris, série A,* n° 3674, 103 p.

PAIN J., BARBIER M., BOGDANOWSKY D., LEDERER E., 1962. Chemistry and biological activity of the secretions of queen and worker honeybees (*Apis mellifica L.*). *Comp. Biochem. Physiol.*, *6*, 233-241.

PAIN J., MAUGENET J., 1966. Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Ann. Abeille, Fr*, *9*, 3, 209-236.

PAIN J., BARBIER M., ROGER B., 1967. Dosages individuels des acides céto-9 décène-2 oïque et hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des reines et des ouvrières d'abeilles. *Ann. Abeille, Fr, 10,* 1, 45-52.

REMBOLD H., HANSER G., 1960. Über den Wieselzellenfuttersaft der Honigbiene. V. Untersuchungen über die Bildung des Futtersaftes in der Ammenbiene. *Z. (Hoppe-Seyler's) physiol. Chem., Dtsch, 319*, 206-212.

ROGER B., PAIN J., 1968. Le couvain, facteur déterminant de la teneur en acide hydroxy-10 décène-2 oïque de la tête des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifica L.*). *C.R. Acad. Sci., Fr, 266,* 2267-2269.

RÖSCH G.A., 1925. Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. *Z. vergleich, Physiol., Dtsch, 2,* (6), 571-631.

SOUDEK ST., 1927. Hltanové zlázy včely medonosné (*Apis mellifica L.*). *Sbornik vysoké školy zemèdèlské v. Brno, 10,* 1-63.

SIMPSON J., RIEDEL I.B.M., WILDING N., 1968. Invertase in the hypopharyngeal glands of the honeybee. *J. Apicultural Res.*, *7* (1), 29-36.

TOWNSEND G.F., LUCAS C.C., 1940. The chemical nature of Royal Jelly. *Biochem. J.*, *34,* 1155-1162.