

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

Janine PAIN, M. BARBIER, B. ROGER

*Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91 - Bures-sur-Yvette,
Institut de Chimie des Substances naturelles, 91 - Gif-sur-Yvette*

SOMMAIRE

Le dosage individuel par chromatographie en phase gazeuse de la phéromone I (acide céto-9 décène-2 oïque ou « Substance Royale ») dans les têtes des reines met en évidence l'existence de concentrations très variables. Un bref traitement par le gaz carbonique réduit en partie l'activité des glandes mandibulaires royales en agissant sur la sécrétion de la phéromone I.

Le dosage individuel de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières est réalisable mais les quantités évaluées sont très faibles et les variations également importantes d'une ouvrière à l'autre. Il n'a pas été possible de montrer la présence de phéromone I chez les ouvrières pondueuses.

INTRODUCTION

On sait que les glandes mandibulaires des reines adultes contiennent l'acide céto-9 décène-2 oïque alors que celles des ouvrières contiennent l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Pour des revues sur la chimie et la biologie de ces sécrétions se reporter aux auteurs suivants (BARKER et col., BUTLER et col., CALLOW et coll., PAIN et coll.).

BUTLER et PATON (1962) ont publié des analyses réalisées sur des extraits de têtes de reines. Ils ont confirmé les résultats précédemment publiés par PAIN, HÜGEL, BARBIER (1960) concernant la présence de traces d'acide céto-9 décène-2 oïque chez les jeunes reines vierges. Les reines vierges âgées de 5 à 10 jours en produisent en moyenne $130 \mu\text{g} \pm 15 \text{ p. } 100$. Cette teneur varie ensuite relativement peu, même après l'accouplement et la ponte des reines.

Le dosage individuel de l'acide céto-9 décène-2 oïque (phéromone I) dans les glandes mandibulaires d'une reine étant possible par la technique de la chromato-

graphie en phase gazeuse, nous avons répété des dosages non plus sur des groupes mais sur des reines isolées. Surtout, nous avons été frappés par les *variations individuelles de la quantité de phéromone I sécrétée*. Ces variations sont aussi importantes chez les reines vierges et chez les reines fécondes.

Parmi les reines préalablement étudiées, certaines avaient été inséminées artificiellement et pour cela soumises à l'action du gaz carbonique. Ce gaz paraissant avoir un effet non encore étudié sur l'état de sécrétion des glandes mandibulaires, nous avons anesthésié des reines vierges dans le but d'évaluer individuellement leur quantité d'acide céto-9 décène-2 oïque.

La technique étant la même pour le dosage de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque contenu dans les têtes des ouvrières, nous nous sommes demandé si un dosage individuel était possible et s'il existait également des variations quantitatives entre les ouvrières.

TECHNIQUE UTILISÉE

La technique consiste à effectuer des broyats de têtes de reines et de têtes d'ouvrières dans l'éther. L'extrait est amené à sec. Nous avons ensuite procédé à l'estérification rapide par une solution étherée de diazométhane des acides contenus dans ces extraits. Après estérification, ceux-ci ont été repris par 100 μ l d'éther pour les reines et par 15 à 20 μ l pour les ouvrières. Avant leur injection les solutions étherées ont été maintenues à 0°C. La quantité de substance injectée dans le chromatographe en phase gazeuse (Appareil W. G. Pye and Co. Ltd Cambridge, Grande-Bretagne, à chambre de détection par ionisation) a toujours été de 2 à 5 μ l pour les reines et de 5 μ l pour les ouvrières.

Les analyses ont été effectuées sur une colonne de 120 cm de long contenant du chromosorb P 30/60 mesh, imprégné d'huile de silicone Dow Corning 550 (5 p. 100). Les conditions d'utilisation de l'appareil sont les suivantes : température 200° - voltage 1 500 - débit de l'argon à la sortie de la colonne 42 ml/mn. Le temps de rétention de l'ester de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque est de 8 minutes, celui de l'ester de l'acide céto-9 décène-2 oïque de 5 minutes. Les limites de détection sont de l'ordre de 0,01 μ g. La sensibilité maximum a été utilisée dans le cas des extraits d'ouvrières, elle est intermédiaire dans le cas des reines.

Pour le dosage individuel des broyats de têtes d'ouvrières, lorsqu'aucun pic n'apparaissait sur le graphique dans les conditions de sensibilité maximum, l'extrait total était amené à 10 μ l. Si après une nouvelle injection de 5 μ l il n'y avait aucun pic observable de même volume de rétention que l'ester de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque l'extrait était alors amené à 5 μ l. Les injections ont été répétées 2 fois dans le cas des reines et dans celui de quelques ouvrières, mais le plus souvent pour ces dernières, il ne nous a pas été possible de renouveler l'injection à cause de la trop faible concentration de l'extrait.

Les dosages quantitatifs des acides trouvés chez les reines et chez les ouvrières ont été obtenus par la comparaison des aires des pics d'enregistrement, avec celles fournies par des échantillons d'esters méthylés des acides céto-9 et hydroxy-10 décène-2 oïque obtenus par synthèse. Les variations enregistrées au cours d'une même série de mesures, pour des quantités identiques d'esters ont permis de constater une variation des surfaces de l'ordre de 10 p. 100.

RÉSULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

I. — Dosage individuel de l'acide céto-9 décène-2 oïque (Phéromone I) dans les têtes des reines

Nous avons utilisé des reines vierges en provenance d'un élevage artificiel. Dès leur naissance, elles ont été mises en présence de jeunes abeilles. Lorsqu'elles ont atteint les âges de 5 à 7 jours, nous les avons réparti en 2 groupes de reines témoins et de reines traitées ayant subi l'action du gaz carbonique. Ces dernières ont été anesthésiées pen-

nant 10 minutes. 24 heures plus tard, nous les avons anesthésiées une deuxième fois, pendant le même temps.

La durée du traitement était comptée dès qu'on observait l'immobilité totale des reines. Toutes les reines ont été tuées 7 jours après la première anesthésie; l'expérience a été répétée une deuxième fois avec des reines élevées dans les mêmes conditions, et traitées de la même façon. Pour l'interprétation statistique des résultats, nous avons appliqué l'analyse de la variance (test F à 2 facteurs). Elle porte sur les chiffres correspondant à la quantité d'acide trouvée par tête de reine (mesures de la surface des pics).

L'ensemble des résultats est reporté dans le tableau 1 ci-après où figurent les valeurs ainsi déterminées pour chaque reine.

TABLEAU I

Quantités d'acide céto-9 décène-2 oïque calculées individuellement par tête de reine (en μg) ⁽¹⁾	
Reines vierges témoins	Reines vierges traitées (CO ₂)
41,0 — 113,5 — 82,5 — 102,5	17,5 — 11,5 — 18,0 — 12,5
55,0 — 57,5 — 70,5 — 28,5	49,0 — 33,0 — 73,5 — 44,0
48,0 — 31,5 — 120,0 — 145,5	130,0 — 0,0 — 65,5 — 31,0
286,0 — 38,0 — 156,5 — 356,0	78,5 — 119,0 — 104,0 — 49,0
Moyenne = 108,2 μg ($n = 16$)	Moyenne = 50,3 μg ($n = 16$)
SX = 1 732,5	SX = 806,0

(1) A cause de l'imprécision des mesures (environ 10 p. 100), nous n'avons pas conservé les valeurs obtenues à 2 décimales près, mais nous avons arrondi à une décimale, pour les besoins du calcul statistique.

Tout d'abord nous insistons sur les variations individuelles de cette sécrétion à l'intérieur des groupes et cela d'une façon générale. Les différences observées ne peuvent provenir des conditions expérimentales qui sont demeurées les mêmes au cours des mesures. Les facteurs qui règlent ces variations individuelles ne nous sont pas encore connus.

Ensuite, nous constatons une action du gaz carbonique sur le taux de sécrétion de l'acide céto-9 décène-2 oïque contenu dans les glandes mandibulaires royales. Nous obtenons une valeur de F significative au seuil de 5 p. 100 (voir le tableau 2 où figurent les résultats de l'analyse statistique).

L'analyse statistique démontre qu'il n'y a pas eu d'interaction entre les 2 lots de reines utilisées. Il est remarquable que cette action soit nette, même après une exposition aussi brève au gaz carbonique.

Quelques auteurs ont étudié l'action du gaz carbonique sur l'Abeille. KLOPFER et QUIST (1955) examinèrent les réactions de choix de l'Abeille et de 2 autres insectes, à différentes concentrations de ce gaz. L'action du gaz carbonique sur la physiologie de l'Abeille est connue par d'autres travaux. Selon RIBBANDS (1950) et SIMPSON (1954) il réduit l'activité des butineuses de pollen mais il incite les jeunes abeilles

à butiner plus tôt (RIBBANDS 1950; AUSTIN, 1955). Il diminue la durée de vie des ouvrières (AUSTIN). Il a une action inhibitrice sur la construction des rayons et sur l'activité des ovaires, des corps gras et des glandes hypopharyngiennes d'après FYG (1950) et SIMPSON (1954). Par contre, chez les reines vierges ou inséminées artificiellement, il a une action accélératrice sur la ponte (MACKENSEN, 1947).

TABLEAU 2

Source de variation	Somme des carrés	Degré de liberté	Carré moyen	Valeurs calculées de F	Valeurs théoriques de F à	
					0,05	0,01
Traitements...	26 825,07	1	26 825,07	4,66	4,20	7,64
Tests	14 920,74	1	14 920,74	2,59		
Interaction ...	101,90	1	101,90	0,01		
Erreur	161 173,60	28	5 756,20			

Dans nos essais, le poids des ovaires des reines traitées et des reines témoins était comparable (5,4 et 5,0 mg par reine) et pratiquement ils étaient dans le même état de développement.

D'après les résultats de MACKENSEN, on aurait pu s'attendre à ce que l'action du gaz carbonique sur les reines et leur sécrétion soit l'inverse de celle produite sur les ouvrières. Il apparaît dans cette étude préliminaire que le gaz carbonique réduit en partie l'activité des glandes mandibulaires royales, en agissant sur la sécrétion d'un de ses constituants.

II. — Dosage individuel de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières (1)

A la suite de ces résultats, nous avons appliqué la même technique d'analyse à l'examen de têtes d'ouvrières en vue de doser la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque produit par une seule abeille.

Déjà en 1960 (BARBIER, PAIN) nous avons procédé à l'analyse globale des glandes mandibulaires de 6 ouvrières, soit naissantes, soit âgées de 14 jours et orphelines, soit d'âge inconnu, prélevées dans la ruche à proximité de la reine. Sur les enregistrements par chromatographie gaz-liquide, nous avons montré l'existence de pics correspondant à la présence d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque chez les ouvrières âgées orphelines ou non, mais sans préciser la quantité obtenue.

Nous avons répété ces essais, en examinant à plusieurs reprises, les broyats de 2, 6, 10 à 15 têtes d'ouvrières orphelines élevées en étuve, alimentées de sucre et de pollen. L'obtention de pics mesurables nous a conduit à procéder à l'examen individuel de têtes d'ouvrières de différentes origines, dans les mêmes conditions d'extraction, d'estérification et de chromatographie que précédemment.

(1) Un examen parallèle des extraits de têtes de fondatrices de diverses espèces de *Bombus* vient de nous montrer l'absence de quantités décelables d'acide hydroxy-10 et céto-9 décène-2 oïque.

Nous avons considéré 2 groupes d'ouvrières, celles provenant de couvain naissant à l'étuve, élevées en caquettes, d'âge connu (15 à 20 jours) alimentées de sucre et de pollen et celles prises directement dans une ruche sur le couvain ouvert, d'âge inconnu.

Dans le premier cas, les ouvrières ont été sélectionnées en fonction du développement de leurs ovaires. Nous pensions par cette méthode, pouvoir signaler en même temps que l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque, la présence de « traces éventuelles » d'acide céto-9 décène-2 oïque, dans les têtes des ouvrières pondueuses, considérées comme des femelles intermédiaires.

Dans le tableau 3, nous avons groupé par essai, les résultats obtenus dans les 2 cas.

TABLEAU 3

Nombre total par essai d'ouvrières examinées individuellement		Date des prélèvements	Nombre d'ouvrières ovigères ⁽²⁾	Nombre de pics non mesurables	Nombre de pics mesurables	Évaluation (en µg) ⁽¹⁾ d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque
1 ^{er} groupe	20	fin avril 1965	16	10 dont 3 correspondent à des ♀ non ovigères	10 dont 1 correspond à 1 ♀ non ovigère	traces pour les 10 ouvrières ⁽³⁾
	19	fin septembre	19	9	10	1,0 — 1,0 — 1,5 3,5 — 6,5 — 7,5 7,5 — 9,0 — 16,5 24,5
	17	début février	17	17	0	0
2 ^e groupe	7	fin mars		2	5	traces pour 3 ♀ 6,5 — 7,0
	9	fin mars 1966		6	3	trace pour 1 ♀ 1,5 — 1,5

⁽¹⁾ A cause de l'imprécision des mesures (environ 10 p. 100), nous n'avons pas conservé les valeurs obtenues à 2 décimales près, mais nous avons arrondi à une décimale, pour les besoins du calcul statistique.

⁽²⁾ Le terme « ouvrières ovigères » a été employé par PAIN, 1961.

⁽³⁾ Nous indiquons l'apparition de traces lorsque les pics correspondent à des quantités mesurables mais inférieures au µg. Les pics sont dans ce cas bien formés. Les pics non mesurables correspondent à des surfaces plus ou moins bien délimitées, difficiles à quantifier.

Dans le premier cas, sur 56 ouvrières examinées individuellement, 10 présentent réellement des pics mesurables en chromatographie gaz liquide de même volume de rétention que l'ester de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque. Les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque évaluées par ouvrière sont faibles puisqu'elles varient

de 1,0 à 24,5 μg , quantité la plus grande enregistrée au cours de ce travail. Les 10 autres contiennent seulement des traces de cet acide.

Il faut remarquer qu'entre chaque série existent des différences dues en partie à la répétition des essais au long d'une année apicole. Ainsi, nous avons été surpris de ne pas trouver d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les 17 ouvrières examinées au début du mois de février. En fonction de ce résultat, nous nous demandons s'il n'existerait pas un cycle de production de cet acide en fonction de la saison, indépendamment du mode d'obtention du couvain.

Chez les ouvrières pondeuses, l'examen des enregistrements ne nous a jamais révélé la présence de pics pouvant correspondre à la présence d'acide céto-9 décène-2 oïque dans les têtes de ces ouvrières prises individuellement ou par groupes de 10 à 15. Par contre, certaines ouvrières pondeuses contiennent de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque en quantité variable, d'autres n'en contiennent que des traces et chez d'autres, il ne nous a pas été possible d'en mettre en évidence.

Dans le deuxième cas, sur 16 ouvrières examinées individuellement, 4 présentent des pics mesurables. Les quantités d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque sont peu élevées : elles oscillent entre 1,5 et 7,0 μg , 4 autres n'en contiennent que des traces.

Au cours de cette deuxième série de mesures, les ouvrières prélevées sur le jeune couvain présentent des variations quantitatives en acide hydroxy-10 décène-2 oïque aussi importantes que celles enregistrées chez les ouvrières pondeuses.

Sur l'ensemble des 72 ouvrières examinées, à peu près le quart de l'effectif permet un dosage individuel quantitatif. Ce résultat permet d'indiquer que si le dosage individuel est possible, *la quantité d'acide hydroxy-10 décène-2 oïque trouvée chez une ouvrière est bien plus faible que celle d'acide céto-9 décène-2 oïque évaluée chez une reine*. Ceci peut tenir à la taille réduite des glandes mandibulaires de l'ouvrière.

Ce résultat est d'autant plus intéressant que cet acide se trouve en grande quantité dans la gelée royale. Ceci nous laisse alors supposer qu'un nombre très important d'ouvrières doivent apporter leur contribution à l'élaboration de cette nourriture. On peut encore penser, en fonction des différences observées entre les ouvrières que certaines sont plus aptes que d'autres à sécréter davantage d'acide. En fonction de ces premiers résultats, on est amené à se demander s'il n'existerait pas un équilibre entre le taux de cette sécrétion dans un groupe d'ouvrières et le taux d'acide céto-9 décène-2 oïque trouvé chez la reine.

Comme chez les reines, nous soulignons l'hétérogénéité quantitative entre les ouvrières d'un même essai : celle-ci ne pouvant être mise en évidence que si l'on effectue des dosages individuels.

Reçu pour publication en décembre 1966.

NOTE DES AUTEURS

Après remise du manuscrit du présent mémoire, nous avons eu connaissance de l'article de R. BOCH et D. A. SHEARER : « 2-heptanone and 10-hydroxy-trans-dec-2-enoic acid in the mandibular glands of worker honey bees of different ages. *Zeitsch. Vergl. Physiol.*, **54** (1), 1967, 1-11.

Ce travail confirme en partie nos propres conclusions en ce qui concerne le dosage de l'acide hydroxy-10 décène-2 oïque dans les têtes des ouvrières et la possibilité d'une variation saisonnière de la teneur en cet acide.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. GERI (Station de Recherches de Biocœnotique et de Lutte biologique, 78-La Minière par Versailles, qui a bien voulu vérifier les données de l'analyse statistique.

SUMMARY

QUANTITATIVE INDIVIDUAL ANALYSIS OF 9-OXYDEC-2 ENOIC
AND 10-HYDROXY-DEC-2-ENOIC ACIDS IN THE HEADS
OF WORKER AND QUEEN HONEYBEES

Determinations were made of 9-oxodec and 10-hydroxy-dec-2 enoic acids in the heads of queen and worker bees by means of gas chromatography.

The method of preparing the cephalic extracts is described.

The determinations of the 9-oxodec-2-enoic acid were made on two groups of virgin queens, one group being controls, the other being submitted to the effects of carbon dioxide. Stress was laid upon the individual variations in the quantities of this acid within the two groups. It was established that carbon dioxide partly decreases the secretion rate of the 9-oxodec-2 enoic acid contained in the royal mandibular glands.

The determination of 10-hydroxy-dec-2 enoic acid were carried out on two groups of workers, those of a known age arising from the emerging brood, and those of an unknown age taken directly from the hive. The former were selected for their ovary development. In all cases, the quantity of 10-hydroxy-dec-2 enoic acid found in a worker was much less than that of 9-oxodec-2-enoic acid found in a queen. The variations from one worker to another were large, regardless of whether or not the worker was productive. It was not possible to detect the presence of 9-oxodec-2-enoic (Pheromone I) in drone laying workers.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUSTIN G. H., 1955. Effect of carbon dioxide anaesthesia on bee behaviour and expectation of life. *Bee World*, **36** (3), 45-47.
- 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. Paris*, **250**, 3740-3742.
- BARKER S. A., FOSTER A. B., LAMB D. C., JACKMAN L. M., 1959. Biological origin and configuration of 10-hydroxy- Δ^2 -decanoic acid. *Nature* **184**, 634.
- BUTLER C. G., CALLOW R. K., JOHNSTON N., 1959. Extraction and purification of queen substance from queen bees. *Nature*, **184**, 1871.
- BUTLER C. G., CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., 1961. The isolation and synthesis of queen substance, 9-oxodec-*trans*-2 enoic acid, a honeybee pheromone. *Proc. r. entomol. Soc. London*, **155**, 417-432.
- BUTLER C. G., PATON P. N., 1962. Inhibition of queen rearing by queen honeybees (*Apis mellifera* L.) of different ages. *Proc. r. entomol. Soc. London*, Ser. A, **37**, 7-9.
- 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. apicult. Res.*, **3** (2), 77-89.
- CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., SIMPSON J., 1959. 10-hydroxy- Δ^2 -decanoic acid in the honey-bee (*Apis mellifera*). *Experientia*, **15** (11), 421.
- FYG W., 1950. Beobachtungen über die Wirkungen der Kohlensäure-Narkose auf Arbeitsbienen. *Schweiz. Bienenztg*, **73** (4), 174-184.
- KLOPFER F. D., QUIST J. A., 1955. Reactions of the mealworm (*Tenebrio molitor*), honeybee and cockroach (*Periplaneta americana*) to some carbon dioxide concentrations. *J. comp. physiol. Psychol.*, **48**, 69-72.
- MACKENSEN O., 1947. Effect of Carbon dioxide on initial oviposition of artificially inseminated and virgin queen bees. *J. econ. Entomol.* **40**, 344-349.

- PAIN J., 1961. *Sur la phéromone des reines d'abeilles et ses effets physiologiques.* Thèse fac. Sci. Paris, série A., N° 3674, 103 pages.
- PAIN J., BARBIER M., BOGDANOVSKY D., LEDERER E., 1962. Chemistry and biological activity of the secretions of queens and worker honeybees (*Apis mellifica* L.) *Comp. Biochem. Physiol.*, **6**, 233-241.
- PAIN J., HÜGEL M. F., BARBIER M., 1960. Sur les constituants du mélange attractif des glandes mandibulaires des reines d'abeilles (*Apis mellifica* L.) à différents stades de leur vie. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **251**, 1 046-1 048.
- RIBBANDS C. R., 1950. Changes in the behaviour of honeybees following their recovery from anaesthesia *J. exper. Biol.*, **27**, 302-310.
- SIMPSON J., 1954. Effects of some anaesthetics on honeybees: nitrous oxide, carbon dioxide, ammonium nitrate smoker fumes. *Bee world*, **35** (8), 149-155.
-