

VINGT-CINQ ANS APRÈS : HISTOIRE DE LA DÉCOUVERTE DE LA SUBSTANCE ROYALE (ACIDE 9-CÉTO (E)-2-DÉCÈNOÏQUE), PHÉROMONE DES REINES D'ABEILLES

Michel BARBIER

*Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S.
91190 Gif-sur-Yvette, France*

RÉSUMÉ

En 1953, PAIN observait pour la première fois qu'une reine d'abeilles morte était toujours attractive pour les ouvrières et gardait son pouvoir inhibiteur de leur développement ovarien. Cette observation marquait le début d'une histoire qui allait conduire, il y a vingt-cinq ans, à l'isolement, l'identification et la synthèse de la substance royale, résultats indépendamment rapportés par des chercheurs anglais et français. L'histoire française de cette entreprise laborieuse est à présent racontée. L'obtention de ces résultats a été rendue possible par l'existence d'une collaboration entre laboratoires de l'I.N.R.A. et du C.N.R.S. qui débuta en 1956 et était toujours active en 1981.

1. INTRODUCTION

La Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux de l'I.N.R.A. à Bures-sur-Yvette a organisé le 23 novembre 1984 une fête en l'honneur du départ à la retraite de son directeur, Jean LOUVEAUX et de Janine PAIN.

De nombreuses personnalités scientifiques assistaient à ces festivités. Citons la présence de Rémy CHAUVIN qui fut le premier directeur de cette Station de Recherches et l'instigateur de collaborations à distance avec des chimistes et biochimistes que son enthousiasme naturel avait réussi à captiver. Cette collaboration allait s'inclure dans une évolution particulière de la recherche, en l'occurrence l'isolement des premières phéromones des insectes. Le mot et son contexte (interactions intraspécifiques) n'existaient pas et l'on parlait d'ectohormone pour reprendre le langage de BETHE ou de télérgone si l'on préférait une proposition de KIRSCHENBLATT (voir la discussion de cette terminologie (BARBIER, 1976) ainsi que pour une revue sur ces questions). La cessation des activités scientifiques de PAIN et de LOUVEAUX devait obligatoirement marquer une coupure dans les

travaux effectués depuis cette époque et c'est la raison majeure pour laquelle la rédaction de cette « histoire de la découverte de la substance royale » a été décidée. Nous avons été précédés en ces aspects historiques sur les phéromones par HECKER et BUTENANDT qui ont récemment publié une revue sur la première des phéromones ayant été isolée, le bombycol de *Bombyx mori* (1984).

2. ANTE-HISTOIRE DE LA SUBSTANCE ROYALE : MISE EN ÉVIDENCE DE L'ACTIVITÉ BIOLOGIQUE A BURES-SUR-YVETTE A PARTIR DE 1953

Cette période de l'après-guerre peut être qualifiée d'héroïque. En ce qui concerne la recherche, la plupart des choses restait à faire, la Station de Recherches de Bures-sur-Yvette étant balbutiante et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de Gif-sur-Yvette n'existant pas.

Sous l'égide de CHAUVIN, PAIN allait s'attaquer à une phénoménologie dont l'étude était nouvelle dans son essence : la compréhension des interactions dans cette société complexe que représente la ruche.

Les recherches entreprises par Janine PAIN dès 1953 allaient marquer le départ de développements importants concernant la société des abeilles en général et leur reine en particulier. Dès cette époque en effet furent publiées les premières observations permettant de conclure qu'une reine morte était toujours capable d'attirer les ouvrières, produisant également dans ces conditions le blocage de leurs ovaires par suite de l'ingurgitation d'une substance présente dans la tête de la reine (PAIN, 1954, 1955). Ces observations allaient susciter une longue série de recherches résumées par la thèse de Janine PAIN en 1961.

3. 1956-1957 : DÉBUTS DE LA COLLABORATION ENTRE LA STATION DE RECHERCHES SUR L'ABEILLE ET LES INSECTES SOCIAUX ET L'INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE

En 1956, sur l'initiative de Rémy CHAUVIN et d'Edgar LEDERER, avec la participation scientifique de Janine PAIN, Jean LOUVEAUX et Michel BARBIER, allait débiter une collaboration qui allait durer 25 ans entre biologistes de l'I.N.R.A. à Bures-sur-Yvette et chimistes du C.N.R.S. à Paris. Ces actions interdisciplinaires n'étaient pas toujours vues d'un très bon œil par certaines autorités scientifiques qui se refusaient à les considérer sérieusement. Il fallait l'inconscience des jeunes chercheurs et le courage des responsables d'équipes pour, en ces temps éloignés, braver quelques opinions rétrogrades et oser se jeter dans de telles

aventures. Avec LOUVEAUX puis Marie-France HUGEL nous devions chercher dans les pollens les substances attirant les abeilles vers leur nourriture et, avec PAIN, nous devions isoler la substance produite par les reines, responsable de l'attraction des ouvrières, de l'inhibition des ovaires après examen par les antennes et ingurgitation. Les techniques modernes pour l'analyse des substances naturelles comme la spectrométrie de RMN ou de masse n'existaient pas et il n'y avait pas d'autres méthodes que la chromatographie sur colonne, les spectrophotométries infra-rouge et ultra-violet en plus des transformations et dégradations chimiques. Des quantités suffisamment abondantes de produits étaient indispensables à la conduite d'une telle analyse. Ces constatations ont fait écrire à HECKER et BUTENANDT (1984) qu'il s'agissait d'une « pioneering period ». Nous n'avions pas la conscience des difficultés ni le sentiment que nous pouvions être des pionniers en quelque manière que ce fût. C'est de toute façon longtemps après qu'il est possible de dire ce genre de choses. Personnellement, en arrivant jeune chercheur chez LEDERER, j'avais eu la possibilité de me familiariser très tôt avec la chromatographie. Les recherches sur les pollens allaient conduire indirectement à la découverte d'un stérol alors inhabituel chez les végétaux, le 24-méthylène cholestérol et à celle du pollinastanol, intermédiaire dans la biosynthèse du cholestérol végétal (BARBIER, 1970 ; DEVYS et BARBIER, 1977) et susciter une série de travaux sur les stérols dépassant l'objectif de départ. Incidemment, avec LAVIE et GONNET, se développaient des recherches sur des thèmes différents concernant les substances bactériostatiques de la propolis (VILLANUEVA *et al.*, 1964, 1970) conduisant à l'isolement de la galangine et de la pinocembrine.

En ce qui concernait plus précisément les reines d'abeilles, avec PAIN, nous allions aboutir à l'isolement de la substance royale, phéromone des glandes mandibulaires, à l'établissement de sa structure et à sa synthèse. La substance royale se distingue historiquement par la date précoce de sa découverte : c'est la seconde phéromone ayant été isolée, après le bombycol du Bombyx du mûrier, obtenu plus laborieusement encore par BUTENANDT et ses collaborateurs (1961) après 20 ans d'efforts. Nous nous savions en compétition dès l'origine avec des collègues britanniques, BUTLER et CALLOW, stimulation puissante s'il en fût, mais parfois génératrice de quelques angoisses.

En 1957 les reines d'abeilles affluent, avec pour fournisseurs les apiculteurs français alertés par un appel lancé par la Station de Recherches de Bures-sur-Yvette, une firme italienne, Piana et la Garon Bee Company, géante apicole américaine. Nous disposions au total de plus de 3 000 reines. On sait à présent, après les dosages effectués par PAIN *et al.* (1974), que selon les saisons les reines contiennent des quantités assez abondantes de substance royale (jusqu'à 1 mg en juin), ce qui fait beaucoup pour un chimiste. Nous étions cependant partis sur une fausse piste, cherchant à isoler la substance des reines attirant

les ouvrières alors qu'elle n'existe pas. Il s'agit d'un mélange attractif perdant son activité par chromatographie ; nous ne le savions évidemment pas et cette fausse direction fut cause de bien des égarements. Dès l'été 1957, après les essais réalisés par PAIN, nous savions cependant que la fraction acide isolée des reines attirait vigoureusement les ouvrières : les extraits déposés sur papier filtre introduit dans une cagette tenaient lieu de reine. Les ouvrières encagées descendaient rapidement de leur rayon de cire pour venir lécher le papier filtre attractif.

Les premiers essais de chromatographie conduisirent facilement à l'isolement d'une substance cristallisée mais qui se révélerait plus tard banale. Dans l'impossibilité de pousser plus avant son analyse, étant donné sa faible quantité, il fut décidé de garder précieusement ces cristaux (faussement prometteurs) dans l'attente de technologies nouvelles.

4. 1957-1959 : ISOLEMENT DE LA SUBSTANCE ROYALE A L'INSTITUT DE CHIMIE ORGANIQUE DE L'UNIVERSITÉ DE BALE

Il devenait évident que nous n'avions pas choisi la bonne voie et que nous n'avions peut-être pas tous les moyens, ni même les méthodes adéquates, pour poursuivre efficacement ce travail. Sur une proposition de LEDERER et avec l'accord de Tadeus REICHSTEIN, il fut décidé que j'irais continuer à l'Institut de Chimie Organique de l'Université de Bâle. C'était le laboratoire le plus proche susceptible d'aider dans ce domaine. REICHSTEIN, Prix Nobel 1950 pour ses recherches sur les hormones des cortico-surrénales, ancien élève de KARRER à l'E.T.H. de Zürich, avait su s'entourer de chercheurs spécialisés dans l'étude des substances naturelles existant en faibles quantités, ce qui n'était pas à négliger, entre autres détails, dans notre cas. De plus, la CIBA de Bâle avait manifesté son intérêt pour notre programme en la personne de WETTSTEIN, son directeur, finançant par ailleurs plusieurs centaines de reines en provenance des U.S.A. ainsi que des produits chimiques. Sans doute l'intérêt manifesté pouvait-il en partie être relié à l'hypothèse que l'on faisait alors d'une substance stéroïde nouvelle chez les insectes puisqu'elle était capable de bloquer le fonctionnement des ovaires chez les abeilles. C'est peut-être aussi, mais c'est une supposition, pour des raisons semblables que BUTLER s'était allié à CALLOW, spécialisé dans l'analyse des stéroïdes, domaine dans lequel il avait acquis une réputation internationale.

C'est ainsi qu'à l'automne 1957 je partais pour Bâle avec dans mes bagages le stock de reines d'abeilles, des extraits, des fractions chromatographiées et le produit cristallisé inconnu. REICHSTEIN me dirigea aussitôt sur le laboratoire d'Othmar SCHINDLER, excellent chimiste et forte personnalité s'il en fut. Pensant aussi que la substance active des reines d'abeilles pouvait être un stéroïde,

il me demanda d'isoler, pour acquérir les méthodes, les bufogénines de sécrétions parotidales du crapaud *Bufo marinus*, soit plus de cent grammes de produit au départ (BARBIER *et al.*, 1959 b ; 1961 b). Si l'analyse fine des substances présentes dans ce venin de crapaud se termina effectivement par l'apprentissage de micro-méthodes, le dégrossissage nécessita par contre l'usage de méthodes semi-industrielles. Le fractionnement utilisa une colonne à chromatographie si grande qu'il fallait prendre l'ascenseur, changer d'étage pour changer de solvant. Cependant, chaque mois, les reines d'abeilles continuaient d'arriver en grand nombre à Bâle. A cet égard une anecdote amusante mérite d'être racontée : les reines arrivant des U.S.A. dans l'éthanol passaient la frontière facilement ; par contre, celles portant la mention « dans l'alcool » étaient régulièrement l'objet des habituelles tracasseries douanières.

En mars 1958, les recherches sur les reines reprirent avec pour objectif l'étude des acides par distillation moléculaire et chromatographie. Les résultats de PAIN montrèrent que la fraction acide de faible poids moléculaire contenait l'activité biologique et c'est sur cette fraction que la chromatographie fut entreprise. Partant du principe suivant lequel la substance active devait posséder quelques fonctions, donc absorber en ultra-violet, les chromatographies sur papier avec phase stationnaire furent observées en U.V. et toute substance ainsi repérée fut isolée. La substance royale des reines d'abeilles était ainsi isolée à Bâle en mai 1958, obtenue à l'état cristallisé (BARBIER *et al.*, 1960 a, b et c) mais l'établissement de sa structure allait présenter d'autres difficultés. Les cristaux amenés de Paris étaient identifiés à notre grande déception au p-hydroxybenzoate de méthyle. Il s'agit de la nipagine, substance utilisée pour la préservation des matières sucrées industrielles données aux abeilles comme nourriture de remplacement.

A cette époque, dans l'Institut que dirigeait REICHSTEIN à Bâle, la chromatographie sur couche mince était inconnue. Les stéroïdes étaient analysés par chromatographie sur papier en utilisant une phase stationnaire, en général la formamide. Cette technique sur couche mince existait chez LEDERER, à l'Institut de Biologie Physico-chimique à Paris où elle avait été importée par Edouard DEMOLE qui l'utilisait précédemment à Genève.

J'avais amené le matériel nécessaire à la confection des couches minces et dès les premiers essais, réussis à convaincre mes voisins de laboratoire que le principe avait du bon, séparant mieux les stéroïdes et étant plus pratique que la phase stationnaire. La plupart des chercheurs finirent par l'adopter (BARBIER *et al.*, 1959 a).

Diverses analyses furent entreprises sur la substance royale cristallisée. REICHSTEIN envoya à CALLOW, notre concurrent britannique, le spectre infra-

rouge de la substance et ce dernier répondit (BARBIER *et al.*, 1960 c) que ce spectre était identique à celui du produit qu'il avait isolé. On y constatait l'existence d'un carboxyle $\alpha\beta$ -insaturé, la présence d'un carbonyle et la nature aliphatique du produit. Ceci, joint au résultat de la micro-titration, éliminait définitivement la possibilité d'une structure stéroïdique. Chaque essai faisant disparaître un peu plus de substance, les expériences furent arrêtées et l'on décida d'attendre l'accessibilité à de nouvelles techniques.

Je suis resté à Bâle jusqu'en juillet 1959 pour achever des travaux entrepris sur d'autres sujets et si, au retour, j'avais dans mes bagages quelques mg de substance royale cristallisée, les recherches côté structure n'avaient pas avancé d'un pas.

5. 1959 : STRUCTURE CHIMIQUE DE LA SUBSTANCE ROYALE (INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE)

De retour à Paris je pouvais disposer d'un appareil à chromatographie en phase gazeuse relativement performant. On ne pouvait espérer mieux pour entreprendre une analyse fonctionnelle de la substance royale par étude microchimique. Utilisant à chaque essai 100 μg , nous pûmes établir la présence du groupe méthylcétone dans un acide $\alpha\beta$ -insaturé en C_{10} et lorsque fin novembre 1959 fut proposée la structure d'un acide 9-céto 2-décénoïque, plusieurs mg de substance royale restaient encore au fond du tube. C'est à ce moment seulement que parut la publication de BUTLER *et al.* (1959) décrivant l'isolement de la substance royale ainsi que le spectre infra-rouge du produit : on y constatait l'existence de ses fonctions et les auteurs ajoutaient que l'on devait avoir affaire à un proche parent de l'acide 10-hydroxy décénoïque précédemment isolé de la gelée royale. Ils ne décrivaient pas la structure complète de la substance et nous pensions garder une petite longueur d'avance dans cette compétition. Nous n'avions pas eu l'idée de publier en urgence l'isolement de la substance et son spectre infra-rouge que nous avons depuis 1958, attendant des résultats complets.

De notre côté, un texte pour publication de la structure de la substance royale fut prêt en février 1960 et, par courtoisie, LEDERER en fit parvenir une copie à nos collègues anglais dont les recherches avaient progressé parallèlement. Ils ne répondirent pas immédiatement. C'est seulement après une seconde lettre que nous en obtiendrons une réponse, donnant leur accord sur la structure que nous propositions et annonçant que leur publication était sous presse (CALLOW et JOHNSTON, 1960). La publication française correspondante sera présentée à la séance de l'Académie des Sciences du 27 juin 1960 (BARBIER et LEDERER, 1960 a) et paraîtra quelques jours après celle de CALLOW et JOHNSTON. A cette

même époque notre synthèse de la substance royale était achevée (BARBIER *et al.*, 1960 b) et l'ensemble de ces résultats était présenté au 1^{er} Symposium sur la chimie des insectes se tenant à Vienne durant le 11^e Congrès international d'Entomologie en août (BARBIER, 1960).

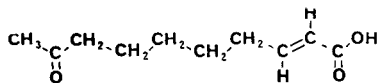


FIG. 1. — Structure chimique de la substance royale

6. SYNTHÈSE DE LA SUBSTANCE ROYALE ET AUTRES ANALOGUES, 1960, GIF-SUR-YVETTE, INSTITUT DE CHIMIE DES SUBSTANCES NATURELLES. POURSUITE DES RECHERCHES EN COLLABORATION 1960-1981

Sur la fin de l'année 1960, le groupe de LEDERER migre à Gif-sur-Yvette dans la proche banlieue parisienne et à quelques km seulement de Bures-sur-Yvette. C'est à la suite des efforts de LEDERER et JANOT que cet Institut fut construit et on oublie peut-être trop facilement les fastidieuses démarches administratives et les oppositions qu'ils durent affronter en cette occasion. Les lieux de travail s'étant ainsi rapprochés, les travaux en collaboration entre Bures-sur-Yvette et Gif se continuèrent ensuite activement sur la société des abeilles et les nombreuses questions qui s'y rattachent. Pour résumer brièvement la série des recherches, elles concernèrent l'inhibition de la construction des cellules royales, l'inhibition ovarienne, le dosage des constituants des glandes mandibulaires, l'étude des variations saisonnières (PAIN et BARBIER, 1963 a ; PAIN, 1973 ; PAIN *et al.*, 1974). La synthèse d'analogues de la substance royale (BARBIER et HÜGEL, 1961) permettra de préciser la relation structure-activité biologique. Cette activité est liée vraisemblablement à un récepteur à double site car la modification de la distance entre les groupes fonctionnels (nombre de CH₂) fait disparaître cette activité. Cette hypothèse sera reprise (ROJAS *et al.*, 1979 ; 1980) et des expériences *in vitro* montreront que la substance royale est inhibitrice des tRNA méthyl-transférases nécessaires à la biosynthèse des protéines, ce qui pourrait expliquer l'inhibition ovarienne. Malheureusement, ces résultats n'ont jamais été transposés *in vivo* de telle sorte que cette inhibition reste du domaine des hypothèses.

Des mises au point signées conjointement par les deux équipes de Bures et Gif seront ensuite présentées (PAIN *et al.*, 1962 ; 1963 a) et des contacts seront gardés jusqu'en 1981 : absence de quantités détectables de substance royale libre dans l'hémolymphe et les ovaires des reines, mise en évidence d'un système de désactivation (PAIN et BARBIER, 1981).

De son côté, Janine PAIN continuera les recherches sur les activités biologiques ; citons, par exemple, l'attraction des mâles par les reines (PAIN et RUTTNER, 1963), la mise en évidence d'un rythme circadien (PAIN et ROGER, 1978), les variations quantitatives en fonction de l'âge des reines (PAIN et ROGER, 1976), l'action sur la physiologie et le comportement des ouvrières (NAHAS-ZAHREDDINE et PAIN, 1981 ; PHAM, ROGER, PAIN, 1982).

7. LA SUBSTANCE ROYALE, PHÉROMONE DE LA REINE D'ABEILLES EN 1985 : L'HEURE DU BILAN

Nous n'aurons jamais réussi, partant d'acides connus, la reconstitution du mélange attractif pour les ouvrières ni même à savoir combien de substances sont réellement indispensables à cette activité. Vingt-cinq ans après nous devons constater que toutes les activités observées pour la substance royale sont restées inexplicées, sans doute parce que dans la société complexe qu'est la ruche, diverses substances des glandes mandibulaires modulent les messages chimiques, qu'il s'agisse de l'attraction des mâles (phéromone *sensu stricto*) des ouvrières, des inhibitions de construction de cellules royales, des inhibitions ovariennes, de la cohésion des essaims... Depuis, la notion de phéromone s'est précisée et un nombre impressionnant de structures est apparu dans la littérature, conjointement avec l'évolution des techniques d'analyse (BARBIER, 1982) et le fait que la plupart de ces produits possèdent un faible poids moléculaire a grandement facilité la tâche. Comme presque toutes les phéromones, la structure de la substance royale est désespérément simple et la fascination que son action sur les ovaires exerçait au début de ces recherches s'est progressivement estompée chez le chimiste, dès le moment où l'on s'est aperçu qu'il ne s'agissait pas d'un stéroïde, en fait. Il restait certes une coïncidence sans plus, car comme la progestérone, la substance royale possède un groupe méthyle cétone et une fonction $\alpha\beta$ -insaturée à chaque extrémité de la molécule. De plus, en se servant de modèles moléculaires, on peut aisément constater que la distance entre ces fonctions est dans les deux cas rigoureusement la même, mais l'hypothèse d'une anti-hormone agissant sur des récepteurs comparables est une analogie fallacieuse.

Puisque l'heure des bilans est venue, signalons qu'entre 1956 et 1981, trente-sept publications seront parues sur ces sujets, dont douze portent les noms des chercheurs du C.N.R.S. et de l'I.N.R.A. Le rôle efficace de PAIN et ROGER réalisant à Bures-sur-Yvette de nombreux et fastidieux essais, le soutien de CHAUVIN et de LOUVEAUX auront été déterminants et nous devons profiter de cette occasion pour les en remercier chaleureusement. Comme très souvent, l'établissement de la structure chimique de la substance royale de la reine d'abeilles il y a 25 ans, aura ensuite posé davantage de problèmes qu'il n'en aura résolus.

Beaucoup d'énergies auront été nécessaires dans cette affaire, mais les résultats de la recherche sont toujours obtenus à de tels prix.

Cette revue historique est dédiée à la mémoire de O. SCHINDLER, grâce aux conseils duquel l'isolement de la substance royale des abeilles a pu être effectué.

Reçu pour publication en mars 1985.

Accepté pour publication en novembre 1985.

ZUSAMMENFASSUNG

25 JAHRE DANACH : GESCHICHTE DER KÖNIGINNENSUBSTANZ

Die Isolierung und Festsetzung der chemischen Struktur der Königinnensubstanz, dem Pheromon der Bienenkönigin (trans-9-Oxo-2-decensäure), sind das Resultat von unabhängigen Forschungen einer englischen und einer französischen Gruppe vor nun 25 Jahren. Hier soll die Geschichte der Forschungsarbeiten und -fortschritte der französischen Gruppe beschrieben werden. Sie sind Folge der Zusammenarbeit der Wissenschaftler der Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux in Bures-sur-Yvette und des C.N.R.S. in Paris und Gif. Bereits 1953 konnte J. PAIN in Bures zeigen, daß eine Substanz im Kopf der Königin in der Lage ist, nach Aufnahme durch die Arbeiterinnen deren Ovarentwicklung zu hemmen.

Die Königinnensubstanz wurde 1958 von M. BARBIER im Laufe seines postdoktoralen Aufenthalts an der Universität Basel bei Professor REICHSTEIN isoliert. Die damals angewandten Techniken erlaubten allerdings nicht die Aufklärung der Struktur der Substanz und so konnte diese Arbeit erst nach Rückkehr nach Frankreich weitergeführt werden.

Die chemische Struktur des Pheromons der Bienenkönigin wurde von der französischen Gruppe (bei Professor LEDERER in Paris) 1959 festgesetzt und die Synthese vollzogen. Die Resultate wurden im Juni 1960 publiziert, zum gleichen Zeitpunkt wie die Ergebnisse der englischen Forschungen. Die gesamten Ergebnisse der französischen Gruppe wurden auf dem 11. Kongress für Entomologie im August 1960 vorgetragen.

Zahlreiche Arbeiten in Zusammenarbeit zwischen den Wissenschaftlern des I.N.R.A. und des C.N.R.S. entwickelten sich und schlugen sich nieder in einer langen Reihe von gemeinsamen Veröffentlichungen, die bis 1981 nicht abriß. Die Untersuchungen auf diesem Gebiet setzten sich getrennt davon im Ausland fort.

Die Königinnensubstanz war das zweite bei Insekten isolierte Pheromon und seine Isolierung bildete ohne Zweifel das Ende einer Epoche in der sich die auf die Analyse natürlicher Substanzen spezialisierten Forscher als Pioniere fühlen konnten. Die Unternehmung war kühn und das Resultat nicht ohne weiteres zu erhalten...

SUMMARY

25 YEARS LATER : THE STORY OF THE QUEEN SUBSTANCE [9-OXO (E)-2-DECENOIC ACID], THE PHEROMONE OF QUEEN HONEYBEES

The isolation and elucidation of the structure of queen substance, the pheromone of the queen honeybee [oxo-9 (E)-2-decenoic acid] were reported independently 25 years ago from English and French teams. The French story of this laborious enterprise is now being told. This was rendered

possible due to a collaboration between research workers from the Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes Sociaux at Bures-sur-Yvette and those of the C.N.R.S. at Paris and Gif. By 1953, PAIN, at Bures, had shown the presence of a substance in the heads of honeybee queens which after licking by workers, was able to inhibit the development of their ovaries.

Queen substance was isolated by BARBIER during his post-doctoral stay with Professor REICHSTEIN at Basle, in 1958. His techniques did not allow identification of the substance until his return to France.

The chemical structure of the pheromone was established in 1959 in the laboratory of Professor LEDERER. The synthesis was carried out and these results were published in June 1960. A review of the results obtained by the French group up to that time was submitted to the 11th Congress of Entomology in August 1960.

A series of collaborative studies was further developed by teams from INRA and C.N.R.S., resulting in a long list of common publications, not completed until 1981. Independent works have been going on since that time in both laboratories.

Queen substance was the second pheromone isolated from insects and undoubtedly its isolation marked the end of a period where specialists in natural products chemistry could once again see themselves as pioneers. As far as we are concerned, this enterprise was indeed quite audacious and the final result obviously did not arrive without difficulty...

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARBIER M., 1960. — Recherches sur la fraction attractive des reines d'abeilles *Apis mellifica*. 1^{re} Symposium International sur la Chimie des Insectes, XI Congr. Int. Entomol., Vienne, 3, 82.
- BARBIER M., 1970. — Chemistry and Biochemistry of Pollens. *Progress in Phytochemistry*, 2, 1-34.
- BARBIER M., 1976. — *Introduction à l'Ecologie Chimique*. Masson Ed., 119 p.
- BARBIER M., 1982. — *Les Pheromones, aspects biochimiques et biologiques*. Masson Ed., Paris, 140 p.
- BARBIER M., JÄGER H., TOBIAS H., WYSS E., 1959 a. — Anwendung der Dünnschicht Chromatographie auf Steroide. *Helv. Chem. Acta.*, 42, 2440-2446.
- BARBIER M., SCHRÖTER H., MEYER K., SCHINDLER O., REICHSTEIN T., 1959 b. — Die Bufogenine des Paratoidenssekretes von *Bufo marinus* (L) Schneider. *Helv. Chim. Acta*, 42, 2486-2505.
- BARBIER M., LEDERER E., 1960 a. — Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifica*). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 250, 4467-4469.
- BARBIER M., LEDERER E., NOMURA T., 1960 b. — Synthèse de l'acide céto-9 décène-2 *trans* oïque et de l'acide céto-8 nonène-2 *trans* oïque. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 251, 1133-1135.
- BARBIER M., LEDERER E., REICHSTEIN T., SCHINDLER O., 1960 c. — Auftrennung der sauren Anteile von Extrakten aus Bienen Königinnen (*Apis mellifera* L.). Isolierung des als Königinnen Substanz bezeichneten Pheromones. *Helv. Chim. Acta*, 43, 1682-1689.
- BARBIER M., HÜGEL M.F., 1961 a. — Synthèses dans la série de l'acide céto-9 décène-2 *trans* oïque (substance royale). *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 951-954.
- BARBIER M., BHARUCHA M., CHEN K.K., DEULOFEU V., ISELI E., JÄGER H., KOTAKE M., REES R., REICHSTEIN T., SCHINDLER O., WEISS E., 1961 b. — Papierchromatographische Prüfung weiterer Krötensekrete. *Helv. Chim. Acta*, 44, 362-367.
- BUTENANDT A., BECKMANN R., STAMM D., 1961. — Über den Sexuallockstoff des Seidenspinners II. Konstitution und Konfiguration des Bombykols. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 324, 84-87.

- BUTLER C.G., CALLOW R.K., JOHNSTON N.C., 1959. — Extraction and purification of queen substance from queen bees. *Nature*, **184**, 1871.
- CALLOW R.K., JOHNSTON N.C., 1960. — The chemical constitution and synthesis of queen substance of honeybees. *Bee World*, **41**, 152-153.
- DEVYS M., BARBIER M., 1977. — Histoire du pollinastanol. *Apidologie*, **8**, 83-88.
- HECKER E., BUTENANDT A., 1984. — Bomkykol revisited. Reflections on a pionnering period and some of its consequences. In : *Techniques in pheromone research* ed. by H.E. Hummel and T.A. Miller, Springer Verlag, 1-44.
- NAHAS-ZAHREDDINE G., PAIN J., 1981. — Effet de l'acide céto-9 décène-2 *trans* oïque, phéromone de la reine d'abeille *Apis mellifica* L., sur le taux de mortalité d'ouvrières engagées. *Apidologie*, **12** (3), 269-288.
- PAIN J., 1954. — Sur l'ectohormone des reines d'abeilles. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **239**, 1869-1870.
- PAIN J., 1955. — Influence des reines mortes sur le développement ovarien des jeunes ouvrières d'abeilles. *Insectes Sociaux*, **2** (1), 35-43.
- PAIN J., 1961. — Sur la phéromone des reines d'abeilles et ses effets physiologiques. Thèse Sci. Nat., Paris, publ. in *Ann. Abeille*, 1961, **4**, 73-151.
- PAIN J., 1973. — Pheromones and Hymenoptera. *Bee World*, **54** (1), 11-24.
- PAIN J., BARBIER M., BOGDANOVSKY D., LEDERER E., 1962. — Chemistry and biological activity of the secretions of queen and worker honeybees (*Apis mellifica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **6**, 233-241.
- PAIN J., BARBIER M., 1963 a. — Structures chimiques et propriétés biologiques de quelques substances identifiées chez l'abeille. *Insectes Sociaux*, **10** (2), 129-142.
- PAIN J., RUTTNER F., 1963 b. — Les extraits des glandes mandibulaires des reines d'abeilles attirent les mâles durant le vol nuptial. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **256**, 512-515.
- PAIN J., ROGER B., THEURKAUFF J., 1974. — Mise en évidence d'un cycle saisonnier de la teneur en acides céto-9 et hydroxy-9 décène-2 oïque des têtes de reines vierges d'abeille. *Apidologie*, **5** (4), 319-355.
- PAIN J., ROGER B., 1976. — Variation de la teneur en acide céto-9 décène-2 oïque en fonction de l'âge chez les reines vierges d'abeilles. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **283**, 797-799.
- PAIN J., ROGER B., 1978. — Rythme circadien des acides céto-9 décène-2 *trans* oïque des ouvrières d'abeilles *Apis mellifica ligustica* S. *Apidologie*, **9** (4), 263-272.
- PAIN J., BARBIER M., 1981. — The pheromone of the queen honeybee : evidence of a deactivating system for queen substance. *Naturwissenschaften*, **68**, 429-430.
- PHAM M.H., ROGER B., PAIN J., 1982. — Variation en fonction de l'âge des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifera ligustica* S.) du pouvoir d'attraction d'un extrait de phéromones royales. *Apidologie*, **13** (2), 143-155.
- ROJAS M., PAIN J., TEKITEK A., ROGER B., BARBIER M., LEDERER E., 1979. — Inhibition *in vitro* de tRNA méthyltransférases par la substance royale, phéromone des reines d'abeilles. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **288**, Ser. D., 1335-1338.
- ROJAS M., TEKITEK A., BARBIER M., 1980. — Inhibition of transmethylases by unsaturated carbonyl derivatives. *Naturwissenschaften*, **67**, 607-608.
- VILLANUEVA V.R., BOGDANOVSKY D., BARBIER M., GONNET M., LAVIE P., 1964. — Sur l'isolement et l'identification de la 3, 5, 7-trihydroxy flavone (galangine) à partir de la propolis. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 292-302.
- VILLANUEVA V.R., BARBIER M., GONNET M., LAVIE P., 1970. — Les flavonoïdes de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bactériostatique, la pinocembrine (dihydroxy-5, 7 flavanone). *Ann. Inst. Pasteur*, **118**, 84-87.