

fiche

SÉRIE A, N° 3674
N° D'ORDRE :



THÈSES

PRÉSENTÉES

À LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Janine PAIN

1^{re} THÈSE

**SUR LA PHÉRORMONE DES REINES D'ABEILLES
ET SES EFFETS PHYSIOLOGIQUES**

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 1961 *devant la Commission d'examen :*

MM. GRASSE *Président.*
POSSOMPES } *Examineurs.*
BERGERARD }

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

1
PAI

(ex - Api - 69)

SÉRIE A, N° 3674
N° D'ORDRE :
4526

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

Janine PAIN

1^{re} THÈSE

**SUR LA PHÉRORMONE DES REINES D'ABEILLES
ET SES EFFETS PHYSIOLOGIQUES**

2^e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le

1961 devant la Commission d'examen :

MM. GRASSE *Président.*
POSSOMPES } *Examineurs.*
BERGERARD }

code API
TH-PAI



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	FORTET	T	Calcul des prob. et physique mathématique.
DE BROGLIE	T	Théories physiques.	SCHWARTZ	T	Calc. diff. et Intégr.
PRENANT	T	Anatomie et histol. comparées	CHOUARD	T	Physiologie végétale.
PÉRÈS	T	Mécanique des fluides et applications.	MALAVARD	T	Aviation. Tech. aéronaut.
BOURCART	T	Géogr. physique et Géol. dynamique.	BRELOT	T	Calcul différentiel.
PLANTEFOL	T	Botanique.	NORMANT	T	Synthèse organique générale.
GRASSÉ	T	Évolution des êtres organisés.	BENARD	T	Chimie minérale (E.N.S.C.P.).
PRÉVOST	T	Chimie organique.	BUVAT	T	Botanique (E. N. S.).
BOULIGAND	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	DUGUÉ	T	Statistiques mathém.
CHAUDRON	T	Chimie appliquée.	SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
WYART	T	Minéralogie et cristallogr.	ULRICH	T	Physiologie végétale (E.N.S.).
TEISSIER	T	Zoologie.	MARÉCHAL	T	Optique théorique et appliquée.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).	KIRRMANN	T	Théories chimiques.
P. AUGER	T	Physique quantique et relativité.	CHAPEAUD	T	Botanique.
MONNIER	T	Physiologie des fonctions.	M ^{lle} LE BRETON	T	Physiol. générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.	SALEM	T	Mathématiques générales.
ROCART	T	Physique (E. N. S.).	LELONG	T	Mathématiques générales.
H. CARTAN	T	Mathématiques (E. N. S.).	DEVILLERS	T	Anatomie et Histol. comparées.
LAFFITTE	T	Chimie Générale.	EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FAVARD	T	Géométrie supérieure.	FRANÇON	T	Physique (S. P. C. N.).
COULOMB	T	Physique du Globe.	GLANGEAUD	T	Géogr. physique et Géologie dynamique.
M ^{lle} COUSIN	T	Biologie animale (S. P. C. N.).	GODEMENT	T	Mathématiques (M. P. C.).
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.	PISOT	T	Calcul des probabilités.
P. DRACH	T	Zoologie.	ROCH E.	T	Géologie.
KASTLER	T	Physique (E. N. S.).	SCHATZMANN	T	Astrophysique.
EPHRUSSI	T	Génétique.	TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique
RIVIÈRE	T	Géologie (S. P. C. N.) Orsay.	ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
GAUTHERET	T	Biol. Végétale (P. C. B.).	LENNUIER	T	Physique (P. C. B.).
LUCAS	T	Recherches Physiques.	RIZET	T	Génétique (Orsay).
A. THOMAS	T	Biol. cellulaire.	ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
ARNULF	T	Optique appliquée.	M ^{me} TONNELAT ..	T	Relativité.
M. MORAND	T	Enseignement de Physique.	DIXMIER	T	Mathématiques (M. P. C.).
SOLLELLET	T	Physique (P. C. B.).	SOUCHAY	T	Chimie générale (P. C. B.).
FORTIER	T	Mécanique expérimentale des fluides.	AIGRAY	T	Electrotechn. générale.
DANJON	T	Astronomie.	BRUSSET	T	Chimie minérale.
PETIT	T	Biologie maritime.	M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
QUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique.	M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
GALLIEN	T	Embryologie.	M ^{me} HUREL-PY ..	T	Biol. vég. (P. C. B.).
EICHHORN	T	Biologie végétale (P. C. B.).	PIAUX	T	Chimie (S. P. C. N.).
DE CUGNACT	T	Biologie Végétale (S. P. C. N.).	BRUN	T	Mécanique expér. des Fluides.
M ^{lle} CAUCHOIS	T	Chimie Physique.	LEDERER	T	Chimie biologique.
THELLIER	T	Physique du Globe.	M ^{me} DUBREIL ..	T	Mathématiques (Agrég.).
L'HÉRITIER	T	Biologie génétique (Orsay).	M ^{me} LELONG	T	Mathém. (E. N. S.).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).	BELLAIR	T	Géologie (S. P. C. N.).
PONCIN	T	Mécanique générale.	COTTE	T	Physique (M. P. C.).
DUBREIL	T	Arithmétique et théorie des nombres.	DUBOIS J. E.	T	Chimie organique (M. P. C.).
QUELET	T	Chimie organique.	LAMOTTE	T	Zoologie (E. N. S.).
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.	MICHEL André ..	T	Chimie générale (Orsay).
CHAMPETIER	T	Chimie macromolécul.	OLMER	T	Énergétique générale.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.	ROUAULT	T	Physique générale.
JUNG	T	Pétrographie.	GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
TRILLAT	T	Microscopie et diffract. électronique.	BARCHEWITZ ..	T	Chimie Physique.
WIEMANN	T	Chimie organique et structurale.	BROSSEL	T	Physique atomique.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).	BUSER	T	Biologie animale (P. C. B.).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.	CAMUS	T	Biol. Vég. (3 ^e Cycle).
DÉSTOUCHES	T	Théories physiques.	CASTAING	T	Physique générale. (Orsay).
PRUVOST	T	Géologie.	CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
AMIEL	T	Chimie des solides.	MOYSE	T	Physiol. Vég. (Orsay).
HOCART	T	Minéralogie et cristallogr.	PANNETIER	T	Chimie (Orsay).
J. P. MATHIEU ..	T	Physique (Orsay).	POSSOMPES	T	Zoologie (P. C. B.).
COUTEAUX	T	Biol. animale (P. C. B.).	PULLMANN	T	Chimie théorique.
MAY	T	Zoologie (Orsay).	TEILLAC	T	Physique nucléaire et radio-activité (Orsay).
CHOQUET	T	Théor. des fonctions et Topologie.	TONNELAT	T	Biol. physicochimique.
FELDMANN	T	Biol. végétale marine (P.C.B.).	VILLE	T	Économétrie.
GUINIER	T	Physique des Solides (Orsay).	WILLEMART	T	Chimie (P. C. B.).
JOST	T	Physiologie comparée.	DODÉ	T	Chimie (Orsay).
			FREYMANN	T	Physique générale (S.P.C.N.).
			GUINOCHE	T	Biol. Vég. (Orsay).
			ROLLET	T	Chimie (P. C. B.).
			M ^{lle} JOSIEN	T	Chimie (P. C. B.).
			CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.

Doyen J. PÉRÈS

ARNOULT	T	Électronique (Orsay).	BOUISSIÈRES	Chimie des Radioéléments (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).	M ^{me} COUTURE ...	Physique (P. C. B.).
DELANGÉ	T	Mathématiques (Orsay).	ELLENBERGER....	Géologie Structurale et Géologie appliquée.
DENY	T	Mathématiques (Orsay).	FRANC	Biologie animale (P.C.B.).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.	SCHNELL.....	Botanique tropicale (Orsay).
LUCAS G.	T	Géologie.	STOLKOWSKI	Physiologie générale (P.C.B.).
ALLARD	T	Chimie Physique.	ACHER	Chimie Biologique (Orsay).
BERTHELOT	T	Physique Nucléaire et Radioactivité.	BAUDOUIN	Biologie animale (P. C. B.).
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'Atmosphère.	BEAUMONT	Biologie animale (S. P. C. N.).
M ^{me} ALBE-FES-			BLAMONT	Géophysique Ionosphère.
SARD	T	Psychophysiol.	BOURREAU	Biologie Végétale (S.P.C.N.) (Orsay).
FRIEDEL		Physique des Solides (Orsay).	CURIE	Physique (M. G. P.).
M. JULIA		Étude des molécules organiques complexes.	DURAND-DELGA ..	Géologie.
LENDER		Biol. Animale. (S. P. C. N.) (Orsay).	FRÉON	Chimie (Orsay).
MAGAT		Physico-chimie des Rayonnements.	HELLER	Physiologie végétale.
M ^{me} QUINTIN	T	Électrochimie.	TORTRAT	Calcul des Probabilités.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	CAILLEUX	Géologie (S. P. C. N.).
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay).	MAGNAN	Physique (P. C. B.).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	DAUDEL	Mécanique Ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique Nucléaire.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	M ^{lle} FOURCROY ..	Biologie Végétale (S.P.C.N.).
HAISSINSKY	T	Radiochimie.	BARRAUD.....	Physiologie cellulaire.
LEMÉE	T	Physiologie B.M.P.V. (Orsay).	NOIROT	Évolution des êtres organisés.
GUÉRIN	T	Chimie (Orsay).	M ^{me} FOURES-	
CHATELET		Chimie (P. C. B.).	BRUHAT	T Mécanique Analytique et Mécanique Céleste.
JEAN		Physique Nucléaire et Radioactivité (Orsay).	M ^{lle} VEIL	Physiologie Générale.
MATTLER	T	Physique (Orsay).	LWOFF	T Microbiologie.
MICHEL (Louis) ..	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).	SIESTRUNCK	T Méca. Physique et expér.
RUMPF		Chimie (P. C. B.).	LACOMBE.....	T Métallurgie (Orsay).
BERGERARD		Zoologie (S.P.C.N.) (Orsay).	BROCHARD.....	T Physique (P.C.B.) (Orsay).
BERTÉIN		Électronique (Orsay).	CABANNES.....	T Mécanique générale.
			LESIEUR.....	T Mathémat. (M.P.C.) (Orsay).
			MAZET	T Mécanique Générale (Orsay)

Secrétaire général R. POUILLAIN.

PREMIÈRE THÈSE

SUR LA PHÉRORMONE DES REINES D'ABEILLES

ET SES EFFETS PHYSIOLOGIQUES

SOMMAIRE

INTRODUCTION	15
--------------------	----

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE.	17
A. — Travaux antérieurs à ceux de Hess	17
B. — Travaux de Hess	18
C. — Travaux de Butler	20
D. — Travaux de Voogd	22
Conclusion.....	23

CHAPITRE II

MATÉRIEL, ET MÉTHODE DE TRAVAIL.....	24
A. — Le Matériel expérimental	24
1° Recherche du couvain naissant	24
2° Répartition des éclosions	25
3° Description des cagettes	28
4° Nourriture	28
Fabrication du candi.....	28
B. — Les méthodes de tests	29
1° Mesure du pouvoir attractif	29
2° Mesure du pouvoir inhibiteur de l'ovogénèse de l'ouvrière.....	32
a) Techniques de présentation des aliments	32
b) Importance du mode d'administration des substances à ingérer	33
c) Étude du développement ovarien	34
— Mode opératoire.....	34
— Classification des stades ovariens.....	35
C. — Matériel et méthode pour apprécier l'inhibition de la construction des cellules royales	38

CHAPITRE III

LOCALISATION DE LA PHÉRORMONE	40
A. — Mise en évidence de l'existence de la phérormone	40
— Méthode	40
B. — Importance de la tête dans la localisation de la phérormone	45

CHAPITRE IV

MODE D'ACTION DE LA PHÉROMONE.....	47
A. — Influence possible de divers stimuli.....	47
B. — Le mode d'action de la phéromone : voie périphérique sensorielle.....	48

CHAPITRE V

NATURE CHIMIQUE DE LA PHÉROMONE	51
A. — Résultats obtenus par chromatographie sur colonne et sur papier	54
B. — Résultats obtenus par chromatographie gazeuse	55
1° Étude de la sécrétion des glandes mandibulaires des reines et des ouvrières d'abeilles	55
2° Étude de la sécrétion des glandes mandibulaires des reines à différents stades de leur vie	56
— Conclusion	58

CHAPITRE VI

LES OUVRIÈRES ET L'APPARITION DE LA PHÉROMONE : LE CYCLE DE LA PHÉROMONE	60
A. — Apparition de la phéromone.....	60
1° Étude des reines vierges n'ayant jamais été au contact d'ouvrières.....	61
2° Étude de reines mises en présence d'ouvrières	62
— Conclusion	64
B. — Durée de contact	65
C. — Essai de mise en évidence d'un cycle annuel d'émission de la phéromone	69

CHAPITRE VII

LES INTÉRACTIONS SOCIALES ET LA PHÉROMONE.....	72
A. — Trophallaxie entre reines vivantes et ouvrières	72
Les échanges entre reine et ouvrières de part et d'autre d'une toile métallique. La notion de groupe indépendant	74
1° Trophallaxie entre ouvrières	76
— Influence de la taille des perforations dans la cloison de séparation	77
2° Résumé et critiques de travaux de MÜSSBICHLER.....	77
Discussions.....	79 à 81
— Conclusion générale.....	81
B. — Comparaison entre reines vivantes et reines mortes du point de vue de l'inhibition ovarienne des ouvrières	82
1° Inhibition de la formation des œufs chez les ouvrières en présence des reines vivantes	85
2° Inhibition de la formation des œufs chez les ouvrières en présence des reines mortes	86
3° Analyse statistique des résultats obtenus.....	86
— Conclusion	87

CHAPITRE VIII

RECHERCHES PARALLÈLES EFFECTUÉES CHEZ LES TERMITES, LES FOURMIS ET LES HALICTES	88
Chez les Termites	88
Chez les Fourmis	89
Chez les Halictes	90
CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	91
A. — Castration alimentaire.....	91
B. — Castration chimique.....	91
1° Importance de la perception de la phéromone par les antennes ...	92
2° Importance de l'absorption par le tube digestif.....	93
C. — Le rôle de l'ouvrière dans la formation de la substance royale	94
RÉSUMÉ	94
SUMMARY	96
ZUSAMMENFASSUNG	98
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	101

Dans un travail tel que celui que je présente aujourd'hui, la persévérance, les efforts personnels si consciencieux soient-ils, auraient été insuffisants sans conseils et sans directives.

M. Rémy CHAUVIN, Directeur de la Station de Recherches Apicoles de Bures-sur-Yvette, fut pour moi non seulement un guide précieux mais encore un maître éclairé et encourageant car dès l'origine, en 1953, il a compris le sens et l'intérêt de recherches qui s'avéraient particulièrement délicates en raison de la nouveauté du sujet. Sa profonde psychologie et son sens aigu de la recherche ont sans cesse orienté et ranimé mes efforts et les ont rendus féconds.

Je remercierai aussi sincèrement M. le Professeur P. P. GRASSÉ, membre de l'Institut, qui a bien voulu, dès le début, s'intéresser au sujet que j'avais choisi et qui a ensuite accepté de présider à la soutenance de cette thèse.

Ma gratitude va également à M. TROUVELOT, Directeur de la Station Centrale de Zoologie Agricole de Versailles, qui m'a toujours montré une sympathie compréhensive et auquel je dois mon orientation dans le cadre de l'I. N. R. A., ainsi qu'à M. l'Inspecteur Général BUSTARRET.

En ce qui concerne les aspects chimiques de mes travaux, la collaboration de M. le Professeur LEDERER et plus particulièrement celle de son élève M. BARBIER, Chargé de Recherches au C. N. R. S., qui s'est intéressé à l'analyse de la « phéromone » et avec lequel j'ai travaillé en toute confiance m'ont été d'une très grande aide.

Je n'aurais garde d'oublier, non plus, tout ce que je dois, depuis des années, à ceux qui m'ont permis, par la formation de mon esprit et l'orientation de mon éducation et de mes études, de réaliser mon rêve de chercheuse : j'entends mes parents ; et aussi ce premier professeur de petit collège provincial qui me fit aimer les Sciences Naturelles.

Enfin, il m'est agréable de remercier tous ceux qui m'ont apporté une aide morale ou matérielle : M. Guy DHUIT, photographe et cinéaste dévoué et consciencieux. M. Georges LOUVEAUX, dessinateur, précis et toujours accueillant — ainsi que tous les collègues, techniciens, scientifiques et secrétaires souvent mis à l'épreuve pour des conseils, des renseignements ou des travaux ingrats mais cependant indispensables.

Je pense aux quelques apiculteurs français, qui m'ont envoyé les reines indispensables, et dans ce domaine, j'adresse mes remerciements sincères à M. PIANA, apiculteur italien.

INTRODUCTION

Depuis très longtemps et sans pouvoir l'expliquer clairement, avait été soupçonnée l'importance du rôle de la reine sur le développement et le comportement des ouvrières d'Abeilles.

Les auteurs qui étudièrent les causes de l'apparition des ouvrières pondeuses, au cours d'un orphelinage, furent les premiers à saisir l'un des aspects de l'influence de la reine sur son entourage. Parmi eux, HESS (1942) songea la première à la possibilité pour la reine, de distribuer aux ouvrières une substance inhibitrice de la formation des œufs dans leurs ovaires ; mais son hypothèse resta sans preuves pendant une dizaine d'années.

Cette substance est sécrétée ou stockée dans les glandes mandibulaires. BUTLER le démontra en 1959 : le contenu de ces glandes empêche le développement des ovaires dans un groupe d'ouvrières orphelines.

La substance mandibulaire est répandue de là sur les téguments, où les ouvrières normalement la prélèvent.

Sa répartition entre les différents membres de la colonie a lieu par la voie des échanges trophallaxiques.

L'action de cette substance est complexe et multiple : elle n'agit pas seulement sur l'apparition d'♀ pondeuses : *elle possède aussi un grand pouvoir d'attraction.* J'ai observé, (LAVIE et PAIN, 1959) que les glandes mandibulaires de reines attiraient les ouvrières tout aussi fortement qu'une reine morte ou vivante. La substance mandibulaire possède aussi la faculté d'inhiber la production d'autres reines, en enrayant la construction des cellules royales dans un groupe d'ouvrières orphelines. (BUTLER et SIMPSON, 1958).

Cependant, bien avant de trouver la source de la « substance royale », ses effets sur la construction des ébauches royales ont été plus spécialement étudiés par BUTLER, en présence de reines vivantes.

Parallèlement, et à la même époque, de mon côté, j'ai observé les effets de *reines mortes* sur le développement des œufs dans les ovaires de jeunes ouvrières d'Abeilles. L'inhibition du développement des œufs est liée directement au pouvoir d'attraction de la reine : les reines les plus attractives étant les plus inhibitrices.

Nous nous trouvons donc en présence d'une substance bien particulière, baptisée par BUTLER (1954) du nom de « queen substance » ; mais dont l'action se restreignait, croyait-on au début des recherches de cet auteur, à l'effet inhibiteur sur la construction des cellules royales.

J'avais appelé (PAIN, 1954) « ectohormone » la substance royale attractive et inhibitrice du développement des œufs, me référant au travail de BETHE (1932), qui entendait désigner par ce terme certaines sécrétions chimiques, actives, non pas à l'intérieur d'un individu, comme les hormones, mais « ecto », à l'extérieur, entre les individus d'une même espèce.

KARLSON, (KARLSON et BUTENANDT, 1959) considéra que ce terme était en contradiction avec la définition même du mot *hormone* : excitation interne (à tort, peut-être ; car, du point de vue étymologique, le mot grec, dont il est dérivé, peut désigner également l'excitation exercée par un individu sur un autre). En accord avec BUTENANDT et LÜSCHER (1959), il créa celui de *phéromone*.

Cette nouvelle dénomination a été critiquée par CHAUVIN, comme très peu euphonique du moins en français et incorrectement dérivée de son origine grecque. Il a proposé d'employer le mot *phérorhormone*, dérivé des mots φέρω (phérô), *je porte, je transporte*, et ὁρμάω (hormaô), *j'excite*. KARLSON (1960) en a donné la définition suivante : ce sont « des substances qui sont sécrétées à l'extérieur d'un individu et reçues par un deuxième individu de la même espèce, chez lequel elles provoquent une réaction spécifique. » Elles agissent à des doses minimes.

Dans cette catégorie de substances, on trouve, à côté de la phérorhormone des reines d'Abeilles, des phérorhormones extraites de Fourmis et de Termites, comme aussi des substances attractives sexuelles de certains papillons, ou encore des substances aidant le « marquage » ou provoquant l'effroi.

Dans le domaine de l'Abeille, une classification s'impose déjà. On ne peut ranger sous la même dénomination les substances attractives (sexuelles, de reconnaissance ou d'« interattraction ») et celles qui provoquent l'effet inverse comme la fuite, l'alarme ou le combat.

CHAUVIN (1960) distingua parmi les phérorhormones : la *phérorhormone proprement dite*, extraite des glandes mandibulaires des reines, les *épazines*, ou substances de « familiarisation », et les *répulsines*. La phérorhormone proprement dite se subdivise actuellement en phérorhormone I, ou substance de Butler, inhibitrice de la construction des cellules royales, et la phérorhormone II, partie odorante et volatile de la phérorhormone proprement dite.

Nous verrons par la suite que, *pour reconstituer l'odeur attractive de la reine, il faut absolument associer à la phérorhormone appelée II, la phérorhormone I, qui par elle-même n'est pas attractive.*

C'est cette propriété particulière de la phérorhormone proprement dite qui a retenu surtout mon attention ainsi que son pouvoir inhibiteur sur l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières.

CHAPITRE PREMIER

HISTORIQUE

Chez les insectes sociaux, l'attraction qu'exerce la reine sur son entourage se traduit clairement par une « cour » d'individus se tenant le plus près d'elle possible et lui présentant souvent de la nourriture.

Mais la présence d'une reine ne se limite pas seulement à la formation d'une « cour » : sa présence provoque des phénomènes internes plus complexes : *la reine empêche l'apparition d'autres individus reproducteurs.*

Lorsqu'elle vient à disparaître dans une colonie, par orphelinage naturel ou expérimental, les Abeilles s'en aperçoivent au bout de très peu de temps, en général une demi-heure, et signalent son absence par un bruit particulier. Si les ouvrières ont alors à leur disposition de très jeunes larves — de moins de trois jours — elles en élèveront aussitôt quelques-unes en reines, transformant leurs cellules en *loges royales*. Mais si elles ne possèdent pas de larves, ou si celles-ci sont trop âgées, elles ne peuvent élever de nouvelles reines et restent orphelines. Un certain pourcentage d'entre elles va alors se transformer en *ouvrières pondeuses à gros ovaires*, bien que le volume de ceux-ci reste bien moindre que celui de l'ovaire de reine.

On ne peut donc séparer le problème de l'apparition de cellules royales de celui de la formation des ouvrières pondeuses.

A. — Travaux antérieurs à ceux de Hess

HUBER, en 1814, avait émis l'hypothèse que, dans les ruches orphelines, des ouvrières pondeuses naissent toujours dans les cellules proches des cellules royales. Ces ouvrières recevraient accidentellement de la gelée destinée aux larves royales. Ce surplus de nourriture aurait alors pour effet de provoquer la formation d'œufs dans leurs ovaires. Cette hypothèse n'explique pas cependant pourquoi l'on obtient des ouvrières pondeuses dans des cagettes placées à l'étuve ne renfermant aucun élevage royal.

DÖNHOF, en 1857, observa également que, chez les populations orphelines, presque toutes les ouvrières se transformaient en ouvrières pondeuses. Il considéra que le développement de leurs ovaires dépendait probablement de facteurs psychiques dus à la perte de la reine.

De leur côté, DADANT, en 1893, puis VON BUTTEL-REEPEN (1915) et LEUENBERGER (1928) constatèrent que, lorsque la ruche devient orpheline, les jeunes Abeilles qui n'ont plus de larves à élever, peuvent utiliser à leur profit leurs propres réserves et pondent peu de temps après.

PEREPELOVA, en 1928, nota que, dans les colonies orphelines, comme aussi dans celles qui possèdent une reine — si elle est vierge — ou si les colonies sont en cours d'essaimage ou de supersédure, apparaissent des ouvrières à gros ovaires. Leur présence ne dépend pas de l'absence de la reine, mais seulement de l'absence de jeune couvain qui supprime la castration nutriciale. TUENIN (1926), puis GONTARSKI (1938) sont du même avis.

HAYDAK, en 1940, étudia deux colonies : l'une est orpheline ; dans l'autre, la reine est engagée et dans l'impossibilité de pondre. Dans la première colonie, mais non dans la deuxième, apparaissent au bout d'un mois dans les cellules des œufs d'ouvrières pondeuses. Il conclut, comme DÖNHOF, à la présence de facteurs psychiques dépendant de la reine et jouant un rôle important dans les réactions de la colonie.

B. — Travaux de Hess

Le travail le plus important est, à notre avis, celui de HESS (1942), qui prouva, contrairement aux hypothèses de DÖNHOF et de HAYDAK, qu'il ne faut pas invoquer, pour expliquer l'apparition des ouvrières pondeuses, des causes psychiques dues à l'absence de reine; mais un *facteur trophique, un échange de nourriture entre reine et ouvrières*.

Nous allons résumer quelques-unes de ses expériences, en raison de la contribution considérable qu'elles apportent à notre sujet :

G. HESS trouve que les ouvrières de 12 ruches orphelines montrent environ 10 à 30 p. 100 d'Abeilles aux ovaires contenant des œufs (ovigères, dans les tableaux) au bout d'une semaine. Une population depuis longtemps orpheline présente toutes les transitions, depuis l'ovaire ne contenant aucun œuf (ouvrière d'une population avec reine), jusqu'à l'ovaire contenant de nombreux œufs mûrs, caractéristique de l'ouvrière d'une population orpheline. Cette maturation de l'ovaire se produit chez des Abeilles d'âges très différents. HESS rend orpheline une ruche expérimentale et y introduit, tous les trois jours, par groupes de 15 à 60, des Abeilles marquées d'âges connus, qu'elle a fait éclore en étuve. Les Abeilles primitives, c'est-à-dire celles qui appartiennent à la ruche, élèvent sur le couvain restant une « reine de sûreté ». Cette reine est enlevée par l'expérimentateur avant qu'elle ait commencé à pondre. A ce moment, c'est-à-dire lors de l'orphelinage définitif, il n'y a donc plus ni reine ni couvain : il se trouve dans la ruche 400 abeilles marquées. Les plus âgées ont 40 jours ; les plus jeunes 14 jours. Les ouvrières ont alors de petits ovaires, sans œuf, mais des glandes hypopharyngiennes bien développées. 25 jours après, 27 p. 100 d'Abeilles ont des œufs dans leurs ovaires et les ouvrières commencent à pondre ; mais leurs glandes ont régressé. Au bout de 32 jours, le pourcentage d'Abeilles ovigères tombe à 13 p. 100 et les glandes sont alors très peu développées. A ce moment les ouvrières pondeuses nourrissent 40 larves de mâles. L'auteur pense que *l'élevage du couvain de mâles par les ouvrières pondeuses a une répercussion sur leurs réserves nutritives et enrave le développement des œufs dans leurs ovaires*. Aussitôt que les cellules renfermant ces larves sont operculées, le pourcentage d'Abeilles ovigères remonte : il atteint 46 p. 100 au bout du 74^e jour de l'expérience. De leur côté, les glandes hypopharyngiennes augmentent également de taille ; mais leur développement, comparé à celui des ovaires, n'est pas si important. La réduction des glandes, au cours de cette expérience, semble indiquer que les ovaires de certaines Abeilles se développent aux dépens des glandes des autres Abeilles.

De tous ces faits l'auteur conclut que *lorsqu'elles sont orphelines, des Abeilles âgées d'au moins 14 jours* (elle n'a pas examiné les Abeilles plus jeunes), *ont la capacité de développer leurs ovaires et de former des œufs*. Cette première conclusion vient renforcer celle de PERPELOVA, qui pense aussi que l'existence des ouvrières pondeuses est en corrélation avec l'absence de jeune couvain.

Cependant HESS a pu obtenir des ouvrières pondeuses en réalisant l'expérience suivante, capitale à nos yeux : elle introduit deux cadres sans couvain, mais garni de 280 ouvrières âgées de 1 à 2 jours, parmi une population non orpheline, mais séparés de celle-ci par deux toiles métalliques, espacées de 5 cm, c'est-à-dire suffisamment écartées pour empêcher les échanges de nourriture. Dans chacun des compartiments, les ouvrières avaient accès à l'extérieur. Les Abeilles séparées de la reine, malgré sa proximité, se comportèrent en orphelines et, au bout de trois semaines, l'auteur trouva, dans le compartiment à deux cadres, du couvain d'ouvrières pondeuses à tous les stades, contenant des larves abondamment pourvues de gelée, et 8 p. 100 de ces ouvrières orphelines avaient des ovaires contenant des œufs. Les glandes hypopharyngiennes étaient également très développées.

La population orpheline finit donc pas devenir bourdonneuse, bien qu'elle se trouve dans la même enceinte que la population non orpheline. *Cette expérience permet d'exclure la présence d'un facteur olfactif*, qui aurait pu agir dans la ruche, par exemple une hypothétique « odeur » de la reine, qui inhiberait le développement des ovaires chez les ouvrières. Mais elle ne permet pas de trancher entre plusieurs autres hypothèses :

1° Ou bien les ouvrières distribuent à la reine une substance qu'elles sécrètent elles-mêmes. Cette substance est fournie à la reine au fur et à mesure de sa formation ; et lorsque l'échange de nourriture est impossible, il s'ensuit nécessairement une accumulation de cette substance dans le corps des ouvrières, ayant pour effet de stimuler leur fonction de ponte.

2° Ou la reine distribue aux ouvrières une substance inhibitrice du développement des œufs.

3° Ou les deux phénomènes : ponte de la reine, d'une part, et inhibition de la ponte chez les ouvrières, d'autre part, dépendent d'un échange mutuel de substances et de stimuli entre reine et ouvrières. Les variations dans la proportion des deux facteurs augmentent ou inhibent le potentiel de génération de l'ouvrière.

4° Enfin les stimuli entre ouvrières paraissent jouer un rôle excitateur dans l'apparition des œufs : en effet, HESS isole au thermostat, à 33°C, 60 jeunes ouvrières. Elles reçoivent, tout au long de l'expérience, une nourriture riche et abondante. Au bout de deux semaines, elle constate que leurs ovaires sont restés très petits et correspondent au stade I. Il n'y a donc pas, dans ce cas, apparition d'ouvrières pondeuses. L'isolement a troublé la capacité de réaction de l'ouvrière et celle-ci n'a pu accumuler ni assimiler la substance de fécondité qu'elle distribue normalement à la reine. HESS souligne que, dans le cas de l'Abeille isolée, l'hypothèse de l'inhibition provenant de la reine est évidemment exclue.

Mais, ce n'est pas ce que nous avons observé (PAIN, 1960). Par l'amélioration des techniques de nourrissage, nous avons forcé l'Abeille à consommer plus de nourriture pollinique. Nous avons ainsi réussi à maintenir en vie, pendant un temps d'observation suffisant, des Abeilles isolées ou groupées par deux, par trois, ou plus. *Les ovaires des Abeilles isolées peuvent former des œufs* ; mais l'apparition du premier

œuf subit un retard très net, par rapport aux ovaires des Abeilles appartenant à des populations plus importantes (50 ou 100 Abeilles). L'influence du nombre se fait déjà sentir à partir d'un groupe de deux Abeilles.

Dans une population qui va essaimer, et chez laquelle on trouve des ouvrières pondueuses, HESS ne put trancher entre l'hypothèse de la substance inhibitrice produite par la reine, qui serait distribuée en quantité insuffisante à la colonie devenue trop forte, et l'hypothèse d'un surplus de substance de fécondité, absorbée par certaines ouvrières, plus prédisposées à former des œufs. Elle ne parut pas concevoir l'idée que les deux hypothèses pouvaient être admises à la fois.

C. — Travaux de Butler

BUTLER aborda en 1954 le problème de l'orphelinage, en étudiant, non pas l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières, mais l'apparition des cellules royales.

Dans un premier type d'expériences, il encage des reines pondueuses, avec un petit nombre d'ouvrières, sur un rayon garni de pollen et de miel, de telle sorte que le degré de liberté entre une reine et les ouvrières, de l'autre côté de la cage, puisse varier, depuis l'association libre jusqu'à la séparation la plus complète. Les expériences sont réalisées sur des colonies de forces inégales, les unes contenant deux mille cinq cents ouvrières, les autres jusqu'à huit mille. Au bout de 48 heures, la colonie est examinée du point de vue de la formation des cellules royales. L'auteur n'en obtient pas dans le cas où les reines sont fixées à une plaquette de bois, ni dans celui où les reines sont enfermées dans une cage construite avec une grille à reine ; mais il en obtient lorsque la reine est emprisonnée dans une cage en toile métallique simple ou double (mailles de 3 mm).

Il conclut que, lorsque les ouvrières d'une colonie renfermant 8 000 Abeilles ou plus, peuvent approcher de leur reine (attachée ou entourée d'une grille à reine) elles ne construisent pas de cellules royales. Si elles ne peuvent l'atteindre (cagette en toile métallique double) ou si elles n'ont avec elles qu'un contact limité (cagette en grillage simple), des cellules royales apparaissent. Dans le cas d'une colonie moins forte (2 500 ouvrières), les résultats sont identiques, mais dans le cas d'une cagette à grillage simple, le nombre de cellules royales formées est plus petit. D'autres expériences ayant confirmé ces faits, l'auteur pense que *plus le nombre d'Abeilles est élevé, plus grand est le nombre de cellules royales construites en l'absence de reine.*

Il déduit que, plus la colonie est forte, plus la reine doit être accessible aux ouvrières, si l'on veut inhiber le pouvoir de formation de cellules royales. Ces observations lui suggèrent que *les ouvrières obtiennent normalement de leur reine une substance particulière, inhibitrice de la construction de cellules royales.* Il pensa d'abord que la « phéromone I » devait être localisée principalement sur l'abdomen. Plus tard, il reconnut qu'elle était circonscrite à la tête ; puis, en 1959, avec SIMPSON, dans les glandes mandibulaires de la reine. Il vérifia que les ouvrières qui viennent de lécher une reine, redistribuent la phéromone I aux autres membres de la colonie par la voie des échanges trophallaxiques — mais, pour inhiber la formation de cellules royales dans une population donnée, il faut qu'elle soit obtenue en quantité suffisante.

BUTLER (1955) imagina un dispositif particulier (fig. 1), permettant d'évaluer la quantité minimum de phéromone I nécessaire pour empêcher un nombre donné d'Abeilles de construire des cellules royales. La pièce essentielle est constituée par une membrane de caoutchouc, percée d'un orifice dans lequel il immobilise une reine. Celle-ci est orientée de telle façon que des portions limitées : ou la tête entière seule, ou la tête accompagnée du thorax et des pattes, sont exposées aux Abeilles du nucléus A, tandis que des portions : ou le thorax entier et l'abdomen, ou seulement l'abdomen, sont exposés en B. Il constate alors qu'il n'est pas nécessaire pour les Abeilles d'une colonie, de nourrir leur reine ou de se nourrir de ses excréments pour obtenir la phéromone : elle provient de toutes les parties de son corps ; mais, pour qu'elle agisse plei-

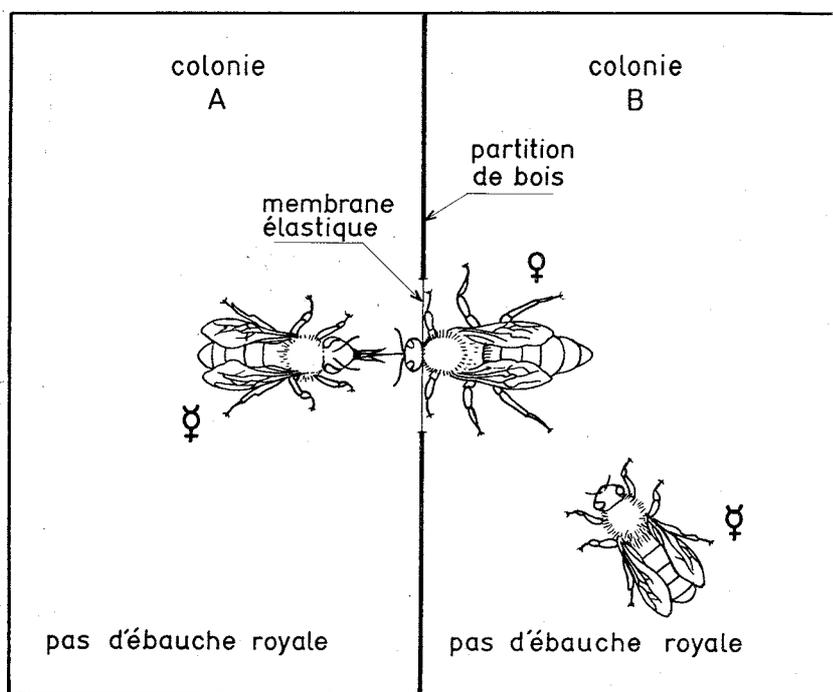


FIG. 1 — Dispositif (cf. BUTLER) permettant d'évaluer la quantité minimum de phéromone I nécessaire pour empêcher des Abeilles de construire des cellules royales.

nement, il faut que les Abeilles aient accès à une certaine surface minimum de son corps. Plus la colonie d'Abeilles est petite, moins grande est la surface minimum nécessaire. Quand la quantité de substance royale est insuffisante, comme dans le cas de supersédure par exemple, (présence de cellules royales dans les colonies possédant déjà une reine), l'inhibition de la production de cellules royales est moins nette.

Selon BUTLER, la phéromone est très fugace: les reines n'attirent plus leurs ouvrières deux heures après leur mort. La quantité de substance que celles-ci obtiennent à ce moment-là n'est que très faiblement inhibitrice de la formation de cellules royales (1).

(1) La phéromone est, au contraire très stable.

Au contraire de BUTLER, nous avons particulièrement étudié l'influence des reines mortes, et montré qu'elles ne présentent pas toutes le même pouvoir d'attraction. L'opinion de BUTLER doit s'appuyer sur quelques reines qui justement ne possédaient pas de phéromone au moment de leur mort, ou n'en possédaient guère.

La poursuite de ses travaux, ainsi que les résultats publiés par nous et d'autres auteurs (DE GROOT et S. VOOGD, 1954), l'amènèrent, en 1956, à penser que l'inhibition de la production de cellules royales, ainsi que l'inhibition ovarienne des ouvrières, devaient dépendre de la *circulation*, au sein des membres de la colonie, d'une certaine quantité de la même « substance royale ».

Pour vérifier cette hypothèse, il mélangea à la nourriture pollinique de jeunes ouvrières orphelines, le contenu stomacal d'ouvrières qui venaient de lécher leur reine. Il constata que le développement des œufs dans ces groupes d'ouvrières était plus faible que dans les groupes de contrôle.

A partir de 1957, il examina l'efficacité d'extraits royaux (acétoniques, alcooliques) sur le tractus génital des ouvrières et du point de vue de la construction des ébauches royales, selon que ces liqueurs imprègnent le corps de la reine « extraite », les corps d'ouvrières mortes, ou qu'ils sont administrés dans la nourriture, solide ou liquide.

La comparaison des pourcentages d'Abeilles ovigères montre une inhibition plus forte quand des groupes d'ouvrières lèchent le corps d'une reine réimprégnée de sa phéromone que lorsque des groupes identiques consomment la même quantité de phéromone, mais administrée dans la nourriture.

En ce qui concerne l'inhibition de la construction des cellules royales, un apport adéquat d'extrait de reines, contenant la phéromone I, suffit à empêcher la construction de cellules royales. Il n'est pas nécessaire pour cela que ces extraits soient associés au corps d'une reine ou d'une ouvrière morte ou à quelque autre support.

Nous discuterons de la technique d'administration de la phéromone, en analysant, au chapitre IV, le mode d'action de la substance royale.

D. — Travaux de Voogd

Les travaux de VOOGD sont postérieurs à ceux de BUTLER et aux nôtres. Elle refit (VOOGD, 1955, 1956) certaines expériences de BUTLER concernant l'efficacité d'extraits acétoniques et alcooliques de reines, sur l'inhibition du développement des œufs dans les ovaires des ouvrières.

Après introduction de cadavres d'ouvrières imprégnés d'extraits de reines dans des cagettes contenant 50 abeilles, elle remarqua qu'un certain nombre seulement d'Abeilles léchaient les corps des ouvrières. Le pourcentage d'ovigères était moindre que celui des ouvrières qui ne s'étaient pas préoccupées des cadavres.

Dans cette expérience il n'y a pas eu apparemment transmission de la substance royale d'une Abeille à l'autre, sinon les ovaires de toutes les ouvrières auraient été dans le même état. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux de BUTLER, qui ne croit pas nécessaire le contact direct ouvrières-reine, le partage de la substance royale s'effectuant entre les membres de la colonie qui possèdent la phéromone et ceux qui ne la possèdent pas. Mais VOOGD (1959) critique vivement l'expérience de BUTLER, qui consiste à introduire plusieurs fois de suite des groupes d'ouvrières venant de lécher une reine, au sein d'une petite colonie orpheline. Nous pensons, comme elle, que *l'introduction répétée d'ouvrières dérange profondément la colonie réceptrice, qui ne se trouve plus dans des conditions normales*, d'où peut-être l'inhibition de la construction de cellules royales. Le transfert de la substance n'est pas démontré, d'autant moins que BUTLER (1954) n'a pas réservé de témoins, en introduisant par exemple des ouvrières *n'ayant pas léché la reine*.

VOOGD (1956) discute *le mode de présentation de la phéromone*, selon qu'elle imprègne le corps d'une ouvrière morte ou qu'elle est incorporée à la nourriture des ouvrières. L'auteur conclut à l'effet inhibiteur de l'extrait de reine seulement lorsque la phéromone est prélevée par léchage sur le corps d'une ouvrière et non dans l'autre cas. Or BUTLER admet au contraire l'efficacité de la phéromone, mélangée à la nourriture, pour inhiber l'ovogénèse et la construction des cellules royales. Mais les expériences de BUTLER sont en réalité de deux sortes : en effet, s'il est vrai, comme cet auteur et nous-même l'avions pensé, au début de ces recherches, que les deux mécanismes d'inhibition (ovaires et cellules royales) puissent être déclenchés par la ou les « substances royales », ils ne mettent sans doute pas en jeu les mêmes processus physiologiques chez les ouvrières et demandent aussi des doses différentes de phéromone. De plus, dans l'expérience de VOOGD, 1959 et dans celle de BUTLER (1957), les extraits sont incorporés à une nourriture solide. Dans l'expérience de BUTLER et GIBBONS (1958) les extraits sont mélangés à une nourriture liquide, différence qui nous apparaît plus importante qu'à ces auteurs.

Conclusion

Pour tirer une brève conclusion de ces données bibliographiques, dont certaines ont dû être présentées de façon détaillée, on remarque avec quelle rapidité, à partir de 1954, les expériences et les résultats se succèdent. On n'avait jamais pu prouver jusque là, d'une façon aussi nette, chez les insectes sociaux, que des extraits de reines pouvaient être responsables de l'inhibition d'autres sexués, soit par empêchement du développement des œufs dans leurs ovaires, soit par inhibition de la construction de loges royales contenant des individus sexués de remplacement.

Devant un champ si large d'expérimentation, BUTLER et nous-même fîmes porter d'abord nos efforts sur la recherche de la localisation, puis de la purification chimique de la phéromone.

Pour cette recherche, nous avons utilisé trois méthodes différentes, que nous allons exposer dans le chapitre suivant.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODE DE TRAVAIL

A. — Le matériel expérimental

Les expériences relatives à l'étude du pouvoir attractif des reines, comme celles qui se rapportent à leur pouvoir inhibiteur de l'ovogénèse des ouvrières, ont été conduites en présence d'Abeilles adultes jeunes, d'âge connu. Elles nécessitent donc l'apport d'un couvain naissant abondant, en parfait état de santé et pouvant supporter une captivité à l'étuve de plusieurs jours ou de plusieurs semaines. C'est pourquoi nous insistons sur la méthode d'obtention de ce matériel.

(Nous traitons à part les expériences se rapportant à l'étude de l'inhibition de la construction des cellules royales, parce qu'elles demandent des ouvrières adultes d'âge plus avancé, et que, d'autre part, le matériel expérimental utilisé est différent).

Les jeunes Abeilles proviennent donc de cadres de couvain operculé, prélevés au rucher dans des colonies réservées à cet usage. A part quelques essais effectués sur des colonies de race noire, les races caucasiennes et italiennes étaient le plus communément mises à contribution. On peut nous faire grief de n'avoir pas toujours travaillé sur des colonies de même race ; mais, même dans ce cas, le chercheur n'est pas à l'abri des variations individuelles. Ainsi de GROOT (1950), étudiant le poids sec et la teneur en azote d'Abeilles naissantes, sur un même cadre, en provenance d'une même ruche, a trouvé que les chiffres variaient d'une cellule à l'autre : les individus, dès le premier jour de leur existence, sont déjà très hétérogènes et cela expliquerait peut-être pourquoi certaines Abeilles, au sein d'un groupe, ont des ovaires contenant moins d'œufs que d'autres.

Pour les expériences exécutées durant la période d'hivernage, le couvain provenait de colonies réactivées par chauffage et suralimentées en pollen.

1^o RECHERCHE DU COUVAIN NAISSANT.

Le couvain doit être prélevé très mûr, c'est-à-dire sur le point d'éclore, ce qui se reconnaît facilement à ce que les opercules des cellules foncent et s'amincissent. A ce moment, on vérifie le degré de maturité, en désoperculant au hasard quelques cellules, à l'aide de pinces souples. Le cadre est bon à prendre lorsque la tête et les antennes de l'ouvrière apparaissent noirâtres et s'animent de mouvements caractéristiques (photos 1 et 2). Les cadres de couvain operculé, transportés trop tôt à l'étuve, ne sont pas dans des conditions optima de développement et ils éclosent plus tardivement. Les ouvrières de ces cadres paraissent aussi moins vigoureuses et vivent moins longtemps encagées.

Les cadres de couvain, une fois choisis, sont alors transportés du rucher jusqu'au laboratoire, dans des boîtes à deux cadres, munies de couvercle, construites en isorel dur de 33 cm de hauteur, 45 cm de longueur et 8 cm de largeur intérieure, préalablement maintenues à 35°C; car il est très important de ne pas refroidir le couvain au cours du transport.

Une fois au laboratoire, les cadres de couvain dans leur étui sont immédiatement entreposés à 33°C.

2° RÉPARTITION DES ÉCLOSIONS.

Les Abeilles naissantes sont encagées par petits groupes, toutes les vingt-quatre heures. A. MAURIZIO (1954) opère de la même façon. De GROOT (1953) les encage au fur et à mesure des naissances, c'est-à-dire toutes les huit heures; mais il pense qu'il eût été préférable de répartir également par cagettes les Abeilles de chaque période d'éclosion, pour éviter l'influence des variations individuelles. Nous avons choisi une période d'éclosion plus longue. De cette façon les individus plus nombreux se répartissent plus facilement et d'une manière plus homogène dans les cagettes. On a ainsi plus de chance de réduire les variations dues au hasard.

Il nous est arrivé quelquefois, par pénurie de couvain en hiver, d'encager des Abeilles âgées d'un à trois jours.

Au début des recherches concernant les problèmes de l'inhibition de la formation des œufs dans les ovaires de l'ouvrière, les Abeilles naissantes étaient réparties dans les cagettes expérimentales par groupes de 30 à 35. Elles étaient préalablement endormies en quelques secondes, au gaz carbonique. Nous avons presque aussitôt abandonné cette méthode, qui risquait de troubler le métabolisme de l'ouvrière. RIBBANDS (1949), anesthésiant pendant quelques minutes au gaz carbonique ou à l'azote des butineuses de pollen, constata qu'à leur réveil elles récoltaient du nectar. Il supposa que l'administration de gaz carbonique provoquait une accumulation de métabolites acides dans le sang de l'Abeille, dont il résultait un vieillissement artificiel. (Les butineuses de pollen sont considérées comme des Abeilles plus jeunes) H. GONTARSKI (1950) établit que les Abeilles oublient la position de leur ruche après anesthésie au gaz hilarant; mais RIBBANDS le contesta. FYG (1950), soumettant, quinze minutes par jour, pendant cinq, trois, ou un jour, des Abeilles prélevées à une ruche normale, dans une atmosphère de gaz carbonique, constata que les ovaires, ainsi que les glandes hypopharyngiennes et les réserves adipeuses, restaient rudimentaires, bien que du pollen se trouvât à leur disposition dans les cagettes.

Donc, par la suite, nous avons évité l'anesthésie; les ouvrières étaient saisies à l'aide de pinces souples et introduites directement dans les cagettes, par groupes de 50 à 55 Abeilles, pour les expériences portant sur l'inhibition ovarienne, et par groupes de 40 pour les expériences relatives au pouvoir d'attraction.

Dans la mesure du possible, nous avons toujours utilisé des Abeilles de début et de milieu d'éclosion, jamais de fin d'éclosion, parce que les Abeilles dernières nées sont en général plus fragiles, et quelques-unes même petites et malformées.

Les cagettes, une fois peuplées, sont maintenues dans une étuve à 33°C. A des températures supérieures, on observe une agitation intense et une augmentation de la mortalité. Les températures inférieures modifient dans un sens défavorable le comportement des Abeilles et influent également sur leur consommation de nourriture qui devient plus faible.

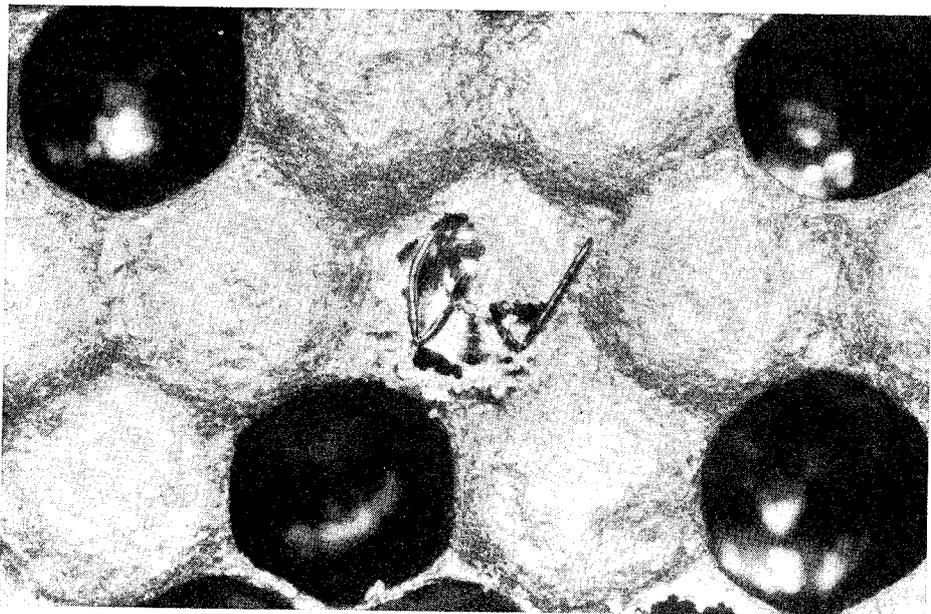


PHOTO 1. — « *Cucain mur.* » Abeille sur le *çoint de raitre.*

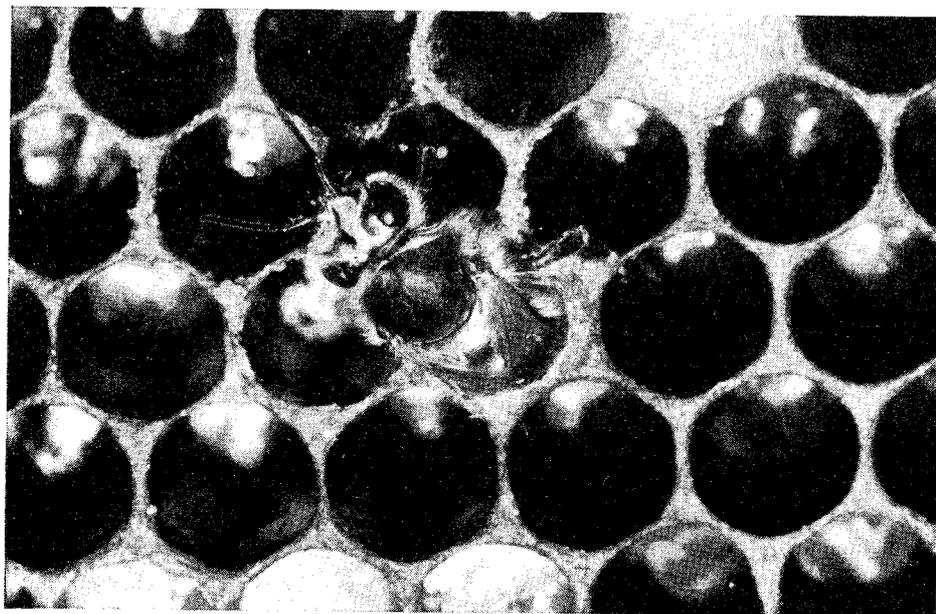


PHOTO 2. — *Abeille naissante.*

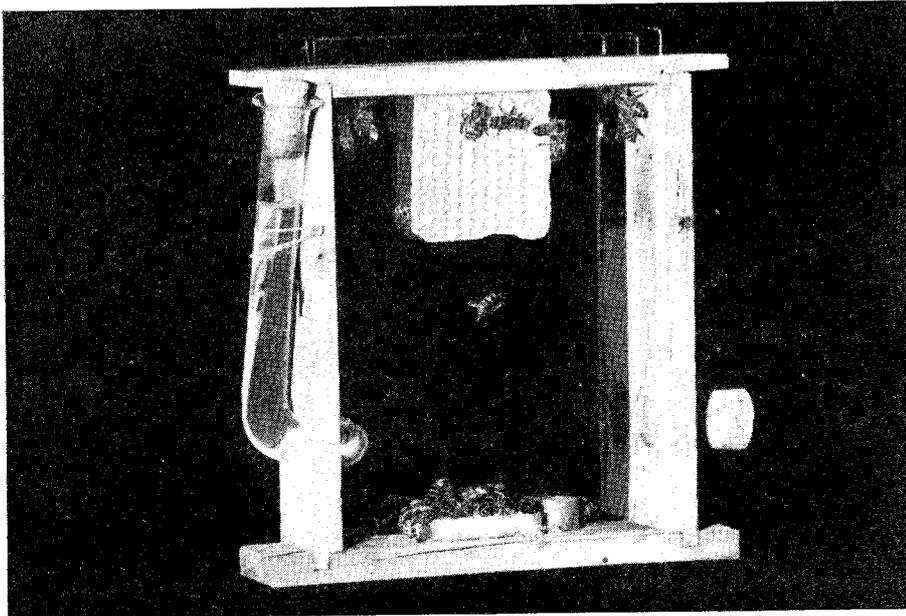


PHOTO 3. — *Cagette d'élevage. (Plan d'ensemble.)*

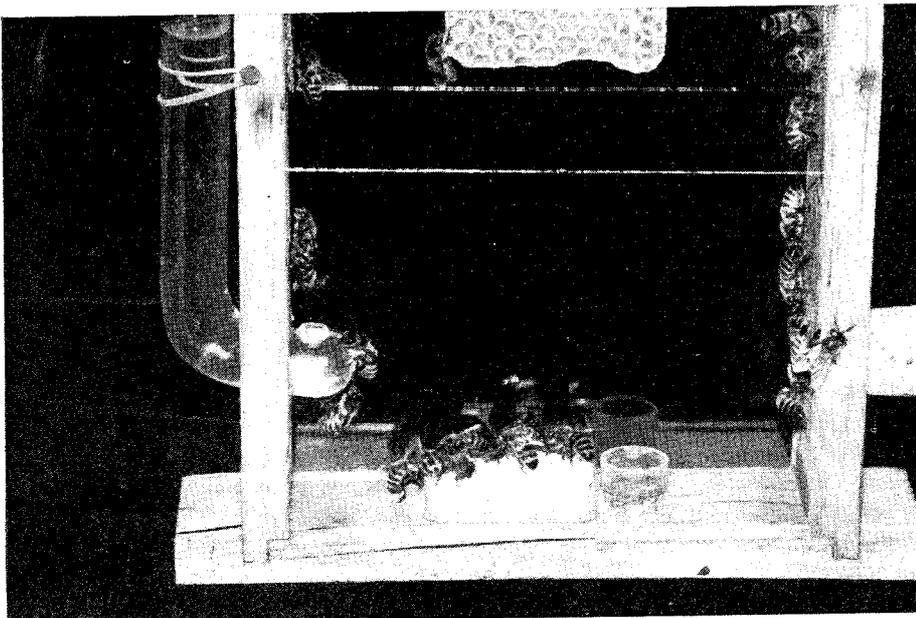


PHOTO 4. — *Cagette d'élevage. (Détails.)*

3° DESCRIPTION DES CAGETTES.

Nous avons utilisé deux sortes de cagettes, inspirées de celles du laboratoire suisse de Liebefeld. Les unes mesurent 18 cm de haut sur 17 cm de long et 6 cm de large. Les autres, légèrement moins grandes, ont pour dimensions 17 cm de haut sur 14,5 cm de long et 4 cm de large. Elles sont construites sur le même modèle, c'est-à-dire qu'elles se composent d'un socle et d'un couvercle en bois, réunis l'un à l'autre par deux rectangles, de bois également, munis de rainures dans lesquelles peuvent glisser deux vitres latérales, de dimensions 13 × 18 cm. Pour prélever des échantillons d'Abeilles, ou enlever les cadavres, il suffit de faire coulisser une des deux vitres dans sa rainure. Les Abeilles sont introduites par l'un des orifices ménagés à la base d'un des rectangles en bois. Par l'autre orifice, on introduit un abreuvoir en verre de 12 mm de diamètre, coudé à 90°, perforé à l'une de ses extrémités, et fermé à l'autre par un bouchon de liège. Ces abreuvoirs sont remplis d'eau pure. L'importance de l'eau, distribuée en quantité suffisante, a été démontrée par WOODROW (1941) et A. MAURIZIO (1946). La longévité des Abeilles maintenues en captivité augmente de huit fois, si, à côté du miel ou du candi, on leur fournit de l'eau.

La cagette est garnie d'un support en cire gaufrée, parfaitement propre. Nous avons tenté de supprimer ce support pour éviter les attaques de teigne (*Galleria melonella* et *Achroea grisella*) ; mais les ouvrières se groupent plus facilement sur la cire (SENDER, 1940) que sur n'importe quel autre support.

Les aliments : sucre et pollen, sont offerts dans des mangeoires en matière plastique de différentes dimensions (photos 3 et 4).

4° NOURRITURE.

Après bien des recherches, nous avons abandonné la nourriture liquide d'eau sucrée ou miellée. En effet, sous cette forme, les Abeilles, qui sont dans l'impossibilité de sortir pour évacuer l'excès de liquide, se gonflent rapidement ; les excréments accumulés dans l'abdomen ne peuvent être rejetés facilement, si bien qu'elles meurent au bout de très peu de temps.

Nous avons préféré une nourriture solide, composée de sucre candi. De l'eau fraîche et potable (eau du robinet) est toujours offerte à part et apporte des substances minérales qui peuvent être utiles.

Fabrication du candi

Pour la fabrication du candi, les proportions sont les suivantes : 2 parties de miel pour 6 de sucre glace. Le mélange se fait au bain-marie jusqu'à l'obtention d'une pâte visqueuse, qui durcit par la suite à l'air, sans devenir friable. Il est très important d'éviter la caramélisation ; car un candi trop chauffé devient toxique pour l'Abeille.

Nous avons toujours utilisé le même stock de miel, au cours d'une année apicole. C'est en général un miel, dont on connaît la formule pollinique récolté sur le territoire du laboratoire. Il comprend souvent du châtaignier, du colza, de l'érable, de la moutarde, du trèfle blanc et incarnant et des arbres fruitiers. Le candi obtenu à partir de ce miel convient aux Abeilles et les attire beaucoup.

Les Abeilles utilisées pour les tests d'attraction ne reçoivent que du candi.

Il n'est pas indispensable de leur fournir de l'eau ; car elles ne sont encagées que pour quelques jours, et nous avons observé qu'elles peuvent vivre sans boire jusqu'à l'âge de 5 et 6 jours.

Celles qui servent à l'étude du pouvoir inhibiteur des reines sont encagées pour une période de temps plus longue. Elles reçoivent en plus du candi et de l'eau un pollen frais riche en azote, qui provient directement d'une trappe à pollen, dont le tiroir est relevé chaque jour. On vérifie tous les jours la quantité de nourriture restante, et le pollen est renouvelé tous les deux ou trois jours, selon les consommations observées, et aussi pour qu'il n'ait pas le temps de se dessécher à l'étuve. Nous avons mis en évidence que les ouvrières consomment les différents aliments *jusqu'au dixième jour* environ de leur encagement, la consommation devenant ensuite presque nulle. C'est pourquoi il est très important d'en surveiller les variations pendant cette période.

B. — Les méthodes de tests

Les deux méthodes de tests que nous allons maintenant exposer sont très différentes, bien qu'elles utilisent au départ un cheptel vivant et un matériel expérimental identiques.

1° MESURE DU POUVOIR ATTRACTIF.

La mesure du pouvoir attractif de reines ou de supports imbibés d'extraits royaux est de beaucoup la plus rapide. Elle s'effectue de la manière suivante :

On utilise de 35 à 40 ouvrières âgées de deux jours, au début de chaque essai. Nous avons signalé en 1955 une sensibilité plus grande de la jeune Abeille à la substance royale attractive. Cependant les Abeilles âgées d'un jour ne sont pas utilisables pour ce test, parce qu'elles se rassemblent très souvent spontanément sur le plancher de la cage et qu'alors il est très difficile de distinguer si elles sont « attirées » par des supports imbibés de l'odeur de reine. On élimine aussi les cagettes dans lesquelles les Abeilles « font la grappe » ; car celle-ci ne se dissocie que si les reines ont un pouvoir attractif très grand ; les reines faiblement attractives étant délaissées.

On compte toutes les 30 secondes, pendant 5 minutes, le nombre de jeunes ouvrières qui viennent auprès de la reine. Cette méthode est utilisée aussi pour apprécier le pouvoir d'attraction de papiers sur lesquels on a déposé des quantités connues de phéromone brute ou d'extraits purifiés, ou encore de papiers filtres ayant entouré le corps de reines vivantes (photos 5-6-7 et 8).

Dès que les Abeilles d'une cagette ont réagi positivement, c'est-à-dire lorsqu'elles ont adopté une attitude caractéristique avec mouvements particuliers des antennes et extension du proboscis, la cagette est éliminée et ne sert plus pour l'examen d'autres reines.

Nous avons en effet remarqué que les Abeilles, qui viennent de lécher une reine ou un support particulièrement attractif, se précipitent aussi sur des reines d'un pouvoir attractif moindre, comme si leur seuil réactionnel se trouvait abaissé. Il faut donc être très prudent pour interpréter les résultats obtenus. Ils obligent l'expérimentateur à un très grand nombre d'observations portant sur de nombreuses ouvrières. Il est donc pratiquement impossible de travailler l'hiver ; car il n'y a pas de couvain naissant en quantité suffisante à cette époque.

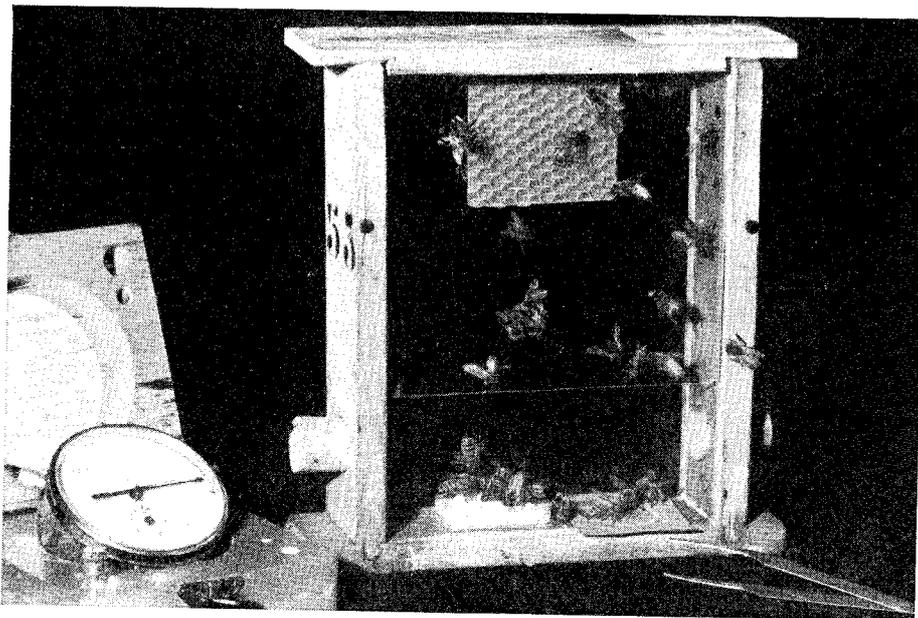


PHOTO 5. — *Mesure du pouvoir d'attraction d'un papier imbibé de phéromone attractive.*

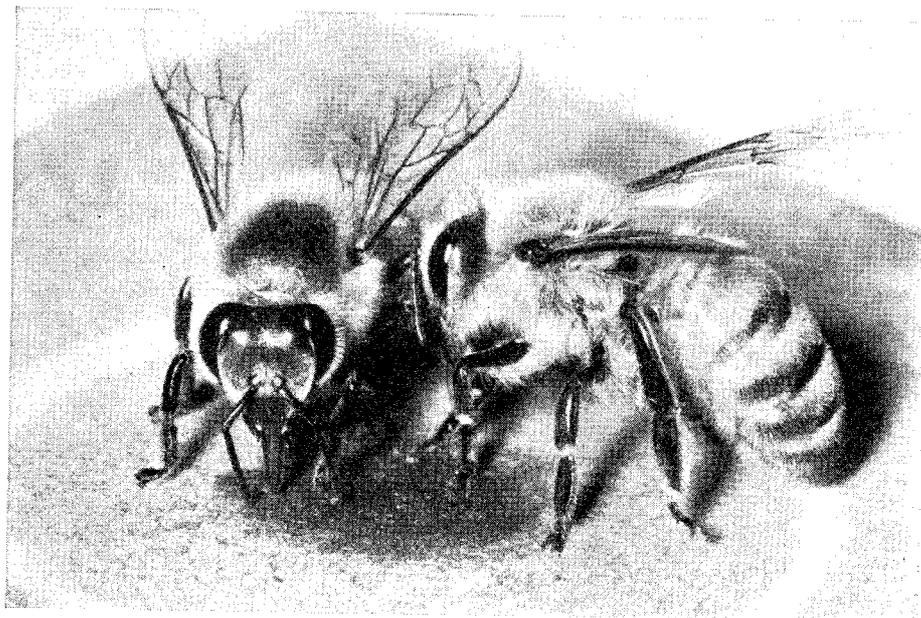


PHOTO 6. — *Abeilles léchant un buvard imbibé de phéromone attractive. (Gros plan.)*

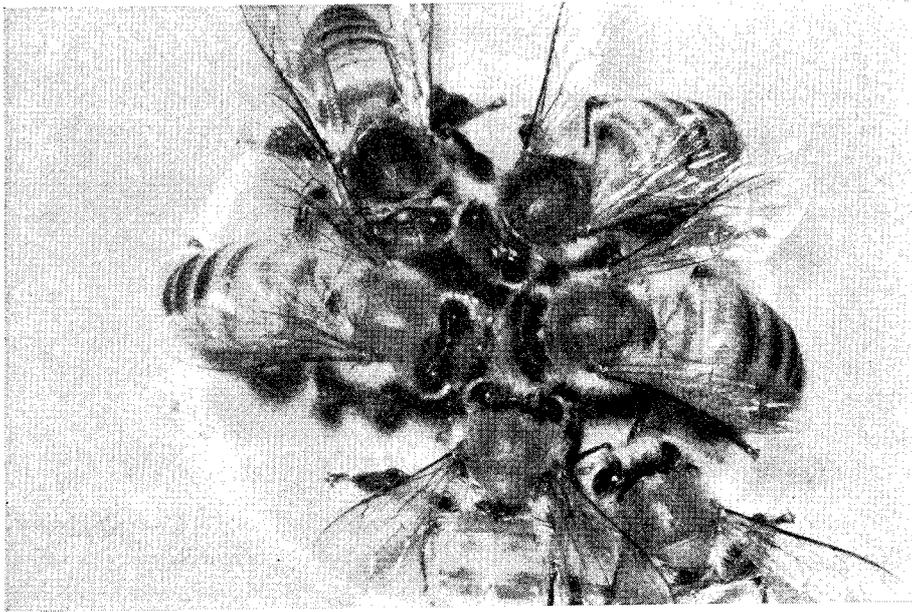


PHOTO 7. — Abeilles léchant un buvard imbibé de phéromone attractive. (Plan d'ensemble)

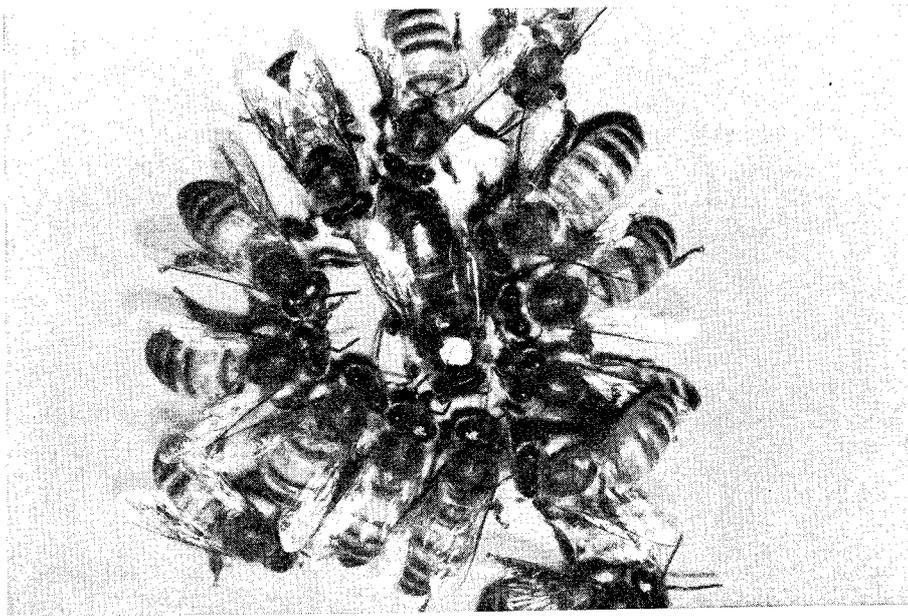


PHOTO 8. — Abeilles attirées par une reine morte.

Lorsqu'un groupe d'Abeilles ne réagit pas à une substance donnée ou à un extrait déterminé, on s'assure que cela ne provient pas d'une anomalie des ouvrières, en leur présentant des reines mortes témoins, très attractives, conservées à cet effet à -30°C .

Lorsqu'un groupe réagit à une substance déterminée, on vérifie qu'elle attire aussi les ouvrières d'autres cagettes.

Pour mesurer le pouvoir attractif, nous apprécions au cours de présentations successives dans une série de cagettes, le chiffre maximum d'ouvrières attirées. On effectue ensuite la moyenne.

Par cette technique, nous avons étudié l'apparition du pouvoir attractif des reines vierges, au cours des différentes étapes de leur vie, et selon qu'elles ont été au contact d'un nombre plus ou moins élevé d'ouvrières. Nous avons pu aussi, au cours des essais de purification, retrouver dans quelle fraction se maintenait le pouvoir attractif.

2° MESURE DU POUVOIR INHIBITEUR DE L'OVOGÉNÈSE DE L'OUVRIÈRE

La mesure du pouvoir inhibiteur des reines sur l'apparition d'ouvrières à gros ovaires est très longue : l'expérience doit se prolonger pendant quinze jours. Nous avons fixé cette limite parce qu'au quinzième jour de nourrissage au pollen apparaissent normalement des œufs dans les ovaires des ouvrières non soumises à l'influence d'une reine vivante ou morte. (Les œufs peuvent d'ailleurs apparaître beaucoup plus tôt). A. MAURIZIO (1954) ne dissèque l'ovaire qu'entre le 23^e et le 33^e jour. Elle soutient en effet qu'au 13^e jour les ovaires ne contiennent pas d'œufs. Leur apparition n'a lieu, d'après elle, que vers le 20^e jour et ce ne serait qu'entre le 20^e et le 27^e jour que les ovaires, comme aussi les glandes hypopharyngiennes et les corps gras atteindraient leur développement maximum. En ce qui nous concerne, nous ne pensons pas que des dissections tardives, comme celles de MAURIZIO, modifient les résultats. Nous avons montré (cf. page 19) lors d'un travail sur *l'apparition du premier œuf* dans les ovaires d'Abeilles isolées, que celui-ci apparaît, dans 50 p. 100 des échantillons, au bout du 15^e jour de nourrissage au pollen. Pour des groupes d'Abeilles plus importants (50 Abeilles), le premier œuf apparaît même le 5^e jour dans les ovaires de plus du tiers de la population. Ces différences dans le mûrissement de l'ovaire tiennent en partie aux techniques employées.

a) Techniques de présentation des aliments.

Au début de ces recherches, le candi et l'eau étaient distribués *ad libitum*, dès le premier jour de l'expérience, et le pollen présenté de deux façons : soit mélangé à diverses concentrations au candi, soit séparément à l'intérieur des alvéoles d'un morceau de rayon bâti.

Sans rompre complètement avec cette première méthode, nous avons cependant été amenée à y apporter quelques modifications. En premier lieu, nous avons abandonné les mélanges avec le candi, à cause de la très grande variabilité des résultats. En effet, non seulement cette technique s'éloigne des conditions naturelles (les Abeilles entreposent séparément miel et pollen), mais, en outre, comme il est très difficile d'apprécier à quelle concentration les Abeilles vont réagir, on risque de fournir

des mélanges trop pauvres ou trop riches en pollen, de sorte que les Abeilles sont obligées, pour absorber les extraits royaux, *de consommer ou trop ou pas assez de sucre*. Ainsi pour des pollens de même teneur en azote, et pour une concentration en pollen de 4 % les pourcentages d'Abeilles ovigères varient de 0 à 66,6 %, pour des concentrations de 8 % ; de 0 à 100 %, pour des concentrations de 16 % ; de 46,6 à 100 % d'ovigères. Les concentrations supérieures à 25 % sont très mal supportées par les Abeilles. Pourtant de GROOT (1953) pense que les mauvais résultats de MELAMPY et de Mc GREGOR (1939) sur la longévité des Abeilles proviennent justement d'une consommation insuffisante en substances azotées, présentées à part du régime sucré ; mais je suis d'un avis opposé. Pour favoriser les consommations en pollen, il est préférable de priver les Abeilles de sucre pendant quelques heures afin de les inciter à consommer le pollen qui reste seul présent alors dans la cagette. Alors pour des pollens comparables, les pourcentages d'Abeilles ovigères sont mieux groupés et ne diffèrent entre eux que par une différence de 0 à 20 %.

Dans la phase expérimentale, nos Abeilles encagées ne reçoivent que du candi, le premier jour et, le lendemain, en plus, le pollen. Celui-ci est additionné d'un peu de miel, de façon à obtenir une préparation à peu près semblable en consistance au pollen que les Abeilles emmagasinent dans leurs rayons (c'est le même miel qui entre dans la préparation du candi ; mais il est pasteurisé à 60°C pendant vingt-quatre heures. Il est toujours fourni dans les mêmes proportions). Le pollen ainsi humecté est ensuite introduit dans des cupules en matière plastique, qui restent en permanence dans les cagettes. En cet état, il est facilement prélevé par les Abeilles.

A partir de ce moment, les Abeilles ne reçoivent du candi que 5 heures par jour, de 10 heures à 15 heures, et sont affamées de 15 heures à 10 heures le lendemain, pendant une période de 15 jours. On s'assure journalièrement de la consommation, en suivant la baisse des aliments à travers la paroi transparente des mangeoires. On ne tient compte des résultats que lorsqu'il y a eu consommation effective, vérifiée par l'examen du tube digestif, lors des dissections. On élimine par cette technique l'influence d'une concentration *trop forte* en pollen, que les Abeilles seraient forcées d'ingérer en même temps que le candi. De GROOT et A. MAURIZIO, lors de leurs expériences sur les longévités, ont signalé les effets désastreux des concentrations trop élevées en azote. Cependant, d'après A. MAURIZIO, les ovaires réagissent mieux à de fortes concentrations.

b) *Importance du mode d'administration des substances à ingérer.*

A chaque série d'expériences correspondent plusieurs cagettes témoins. Les unes reçoivent, comme nous venons de le décrire, du candi et du pollen additionné de miel ; les autres du candi et du miel. Les cagettes expérimentales contiennent en plus, soit des reines, soit des extraits royaux, recueillis au cours de la purification de la substance royale.

Dans le cas de la présentation d'extraits non attractifs, ceux-ci sont incorporés, en proportions connues, à des quantités mesurées de nourriture pollinique ou de nourriture sucrée.

Dans le cas où les extraits sont attractifs, ils sont offerts, séparés des aliments, sur un morceau de papier filtre, que l'on imbibe plusieurs fois par jour, et que les ouvrières viennent lécher quotidiennement.

La prise de la phéromone, lorsqu'elle est présentée selon cette deuxième technique, détermine le maximum d'inhibition ovarienne, et les pourcentages d'Abeilles ovigères sont toujours plus faibles, ce qui indique une inhibition plus efficace de la part des reines ou des extraits attractifs.

La preuve de l'efficacité de la phéromone, lorsqu'elle est administrée à part de la nourriture, ne fait que renforcer nos conclusions. Nous avons démontré en effet que, lorsque le pollen est offert aux Abeilles, mélangé au candi, les pourcentages d'Abeilles témoins ovigères obtenus pour une même concentration, sont excessivement variables et qu'en outre cette technique s'éloigne des conditions naturelles. Certains Hyménoptères solitaires, en effet, administrent bien à leurs larves une bouillie de nectar et de pollen fort épaisse, mais l'Abeille, les Bourdons et les Mélipones sont les seuls à entreposer nectar et pollen séparément. La méthode consistant à mélanger la substance inhibitrice au candi ne convient donc pas forcément aux ouvrières. Celles-ci, en effet, ne peuvent régler séparément leurs ingestions de sucre et de pollen, à cause du mélange et sont obligées de consommer trop de sucre ou trop de pollen, pour une quantité minimale de substance, d'où son peu d'efficacité sur les ovaires. L'inhibition du développement des œufs, obtenue par BUTLER suivant cette méthode, est plus faible que celle que nous avons obtenue suivant notre technique des papiers filtres. Nous ne nions pas cependant que l'autre technique puisse donner des résultats ; mais ceux-ci sont certainement plus irréguliers.

c) Étude du développement ovarien.

À la fin de l'expérience, c'est-à-dire à partir du 15^e jour de nourrissage, toutes les Abeilles sont endormies au gaz carbonique et tuées au chloroforme. On prélève alors au hasard un échantillon de 15 Abeilles au minimum par cagette, pour la dissection immédiate dans un sérum physiologique.

Les dissections ont été exécutées sous la loupe binoculaire Nacet, grossies 9 fois ; nous avons continué avec la loupe binoculaire Zeiss, avec un grossissement de 50.

Mode opératoire.

L'Abeille ouvrière est fixée les ailes coupées, à l'aide d'aiguilles entomologiques dans la cuvette à dissection. C'est une simple boîte de Pétri de 7 cm de diamètre, dans laquelle on a versé un mélange de cire et de noir animal. À l'aide de pinces fines et d'un éclat de lame de rasoir monté sur un porte-équarisseur, on pratique une incision médiane et longitudinale des quatre premiers segments abdominaux. On enlève ensuite avec les pinces les huit tergites, ainsi que le tissu adipeux et le cœur tubulaire, qui apparaissent juste au-dessous. On aperçoit alors la masse énorme de l'intestin postérieur, coloré en jaune, et les glandes rectales attenantes, l'amorce de l'intestin grêle et une partie de l'intestin moyen. Celui-ci est disposé en forme de croissant au-dessus de l'intestin postérieur. C'est en soulevant l'intestin moyen, et de chaque côté de celui-ci, qu'on aperçoit les ovaires. Ils sont souvent réunis entre eux à l'apex par un fil très mince et s'étirent depuis la hauteur du jabot jusqu'au sixième ganglion abdominal. Les oviductes ont l'aspect de deux filaments blanchâtres, qui se réunissent en un canal commun sous le sixième et septième ganglion abdominal. Si l'on enlève avec précaution le septième ganglion abdominal, très proche du sixième, on aperçoit sur le vagin transparent la spermathèque

de l'ouvrière et son canal minuscule. G. HESS a examiné vingt-cinq réceptacles séminaux d'ouvrières et leur attribue la moyenne de 77 microns de diamètre.

L'ensemble du tractus génital de l'ouvrière est entouré d'un tissu trachéen abondant.

Il se dégage de l'ensemble des dissections que la *variabilité des ovaires*, en fonction de l'alimentation et de l'orphelinage, *est très grande*. On a observé en effet tous les degrés de développement possibles, depuis l'ovaire filiforme, sans œuf, jusqu'à celui de l'ouvrière pondreuse. Mais, même lorsque l'ovaire de l'ouvrière est développé, la spermathèque, bien qu'un peu plus grosse que chez une ouvrière normale, reste petite et incapable de fonctionner.

Chaque ovaire disséqué est affecté d'un numéro (de I à V), indiquant son degré de développement. Pour la numérotation des différents stades observés, on se réfère à un système de dessins représentatifs de cinq stades typiques de l'ovaire, que nous avons légèrement modifié, en nous inspirant de la classification de G. HESS (1942).

Classification des stades ovariens.

Pour établir la classification, nous nous sommes préoccupée uniquement du *degré de transformation des ovarioles*, qui résulte d'une augmentation du nombre et de la taille des œufs, et d'une différenciation de plus en plus poussée des cellules nutritives entourant les ovocytes ; le *nombre* des ovarioles est déjà fixé chez les jeunes nymphes.

Stade I. — Les ovarioles ont l'aspect de filaments grêles et transparents. A ce stade, ils ne sont pas divisés en chambre et ne renferment, par conséquent, aucun noyau volumineux.

Stade II. — Le contenu des ovarioles est moins transparent. On commence à apercevoir la division en chambres, avec des noyaux dans chacune d'elles. Il n'est pas possible de différencier encore les ovocytes des cellules nourricières.

Stade III. — Les ovarioles sont nettement divisées en chambres. On distingue maintenant les cellules nourricières des ovocytes. On range dans ce stade les ovaires qui renferment par ovariole de 1 à 4 œufs bien formés, mais dont la taille reste petite, comparée aux stades IV et V.

Stade IV. — Les ovaires sont bien développés et renferment des ovocytes bien individualisés dans chaque ovariole. On pourrait y compter les œufs et les cellules nourricières. Déjà, à ce stade, on peut voir quelquefois un œuf, engagé dans chacun des deux oviductes.

Stade V. — L'ovaire énorme remplit presque entièrement la cavité abdominale, sans toutefois atteindre la taille de l'ovaire de reine. On le compare généralement à un ovaire de guêpe. Les œufs sont gros et allongés ; mais il devient impossible de les dénombrer. Très souvent, les plus volumineux se trouvent engagés dans les oviductes. Certains même sont prêts à être expulsés (photos 9 et 10).

En aucun cas nous n'avons tenu compte de la longueur et du nombre des ovarioles. Ces deux facteurs sont en effet très variables et ne semblent pas en rapport avec le développement de l'ovaire. Dans un premier travail de biométrie, publié avec la collaboration de VERGÉ, en 1950, nous avons examiné le premier de ces facteurs. Nos résultats confirment ceux de HESS, à savoir que la moyenne des longueurs des ovaires gauches est systématiquement supérieure à celle des ovaires droits, et qu'un ovaire très long n'est pas forcément un ovaire mature.

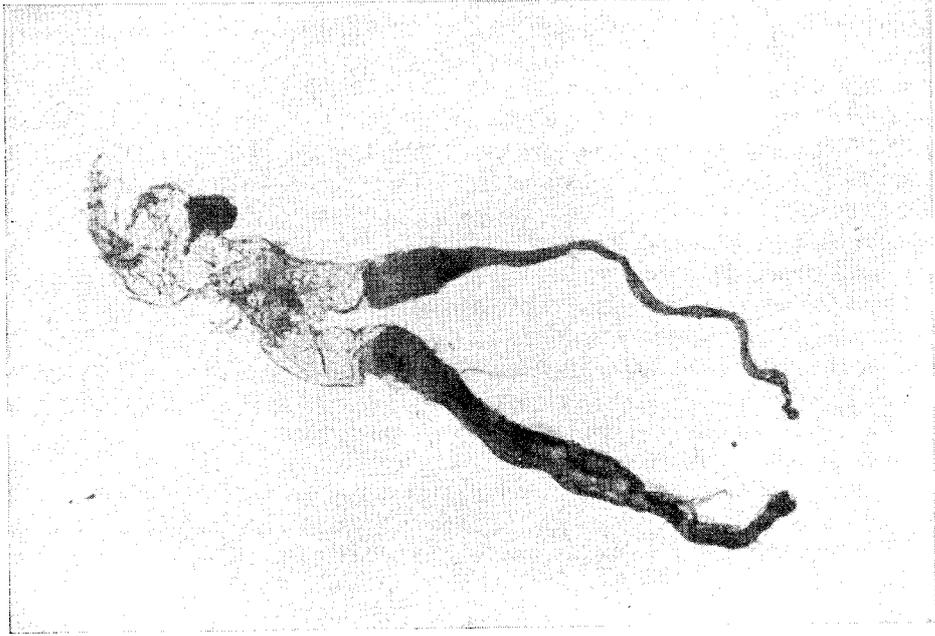


PHOTO 10. — Ovaires d'ouvrière non ovipare (glossis 22 fois) spermatheque visible

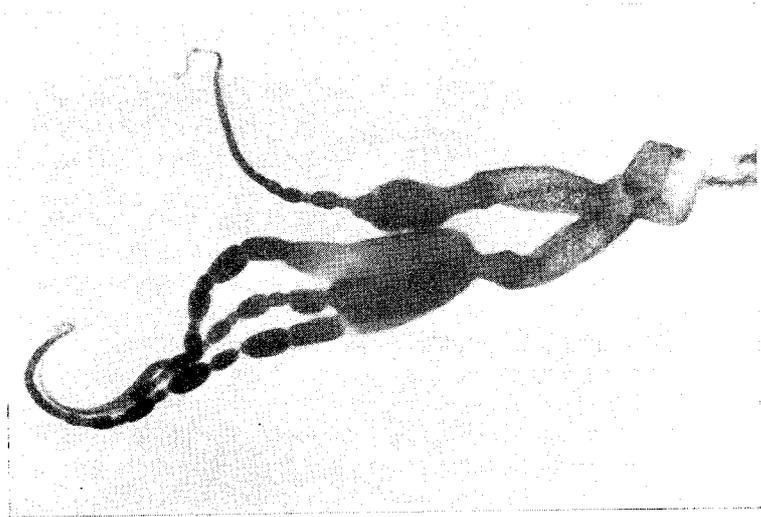


PHOTO 9. — Ovaires d'ouvrière pondreuse (glossis 16 fois) œufs visibles.

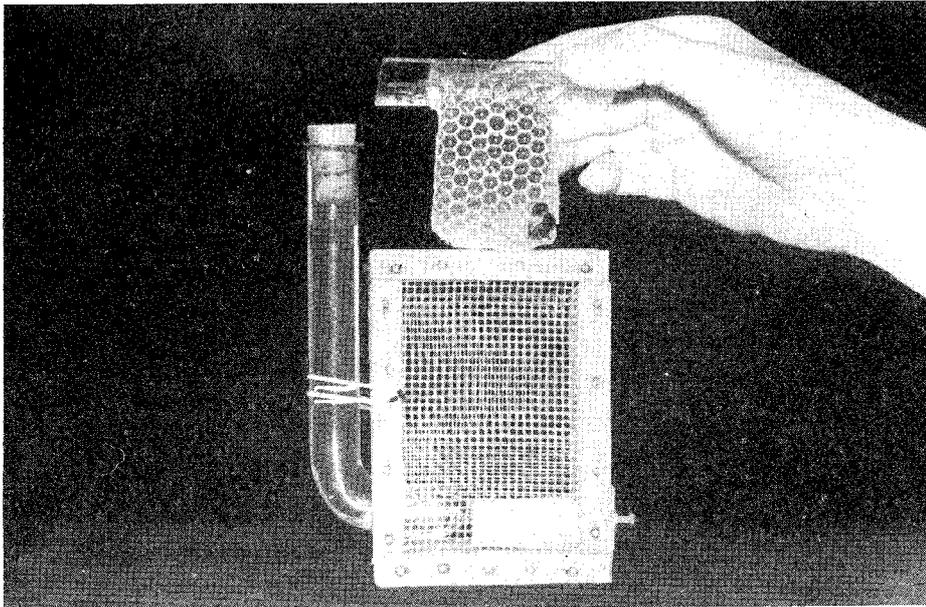


PHOTO 11. — Cagette utilisée pour l'étude de l'inhibition de la construction de cellules royales.
Cire témoin avec deux ébauches de cellules royales.

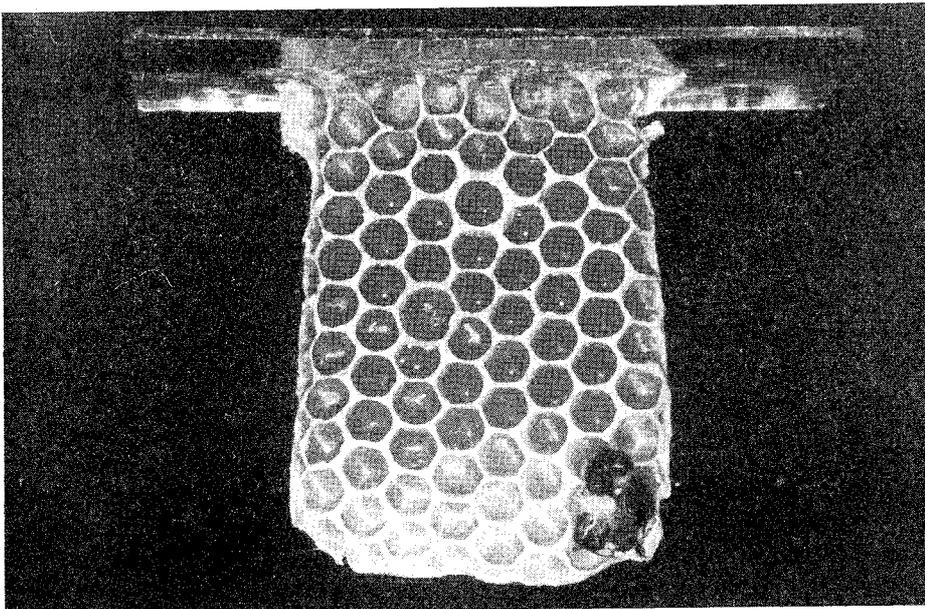


PHOTO 12. — Détail du morceau de cire bâtie :
— Ouvrières imbibées d'éther sans phéromone 1.
— Apparition de deux ébauches royales.

Quant au second facteur, le nombre des ovarioles, les dissections révèlent par exemple aux stades I et II, deux ovaires réduits chacun à un filament ou comportant de deux à vingt tubes non différenciés. De plus, et dans presque tous les cas, les deux ovaires, de longueur inégale, comme nous l'avons exposé, ne renferment pas le même nombre d'ovarioles ni la même quantité d'œufs. Aussi peut-on apercevoir, au stade III, un ovaire réduit à un tube et l'autre comprenant un à deux tubes, avec chacun 1 à 4 œufs. On peut voir aussi, sur un même ovaire, un à deux tubes ne contenant pas d'œuf, accolés à un ou deux tubes qui en contiennent quelques-uns.

Nous comptons les stades I et II pour non développés, et les stades III, IV et V pour développés. Cela revient à considérer seulement deux étapes de développement : un état immature, aux ovaires ne contenant pas d'ovocytes et un état de différenciation cellulaire, aux ovaires contenant des œufs. Pour la clarté du texte et des tableaux, nous rappelons l'expression ovigères. (Abeilles aux ovaires contenant des œufs).

Nous admettons que les ovaires qui n'ont pas été inhibés ont réagi à la nourriture dès qu'on peut noter l'apparition d'un œuf dans l'un des deux ovaires. Pour des évaluations plus précises nous avons tenu compte des différents stades décrits ci-dessus.

Puisque le nombre d'Abeilles disséquées, présentant des œufs dans leurs ovaires, est rapporté à 100 individus, nous avons considéré arbitrairement que le chiffre 33,3 p. 100 d'abeilles ovigères, correspondant au tiers des Abeilles prélevées, représente la limite inférieure du développement ovarien de la population. C'est la proportion trouvée d'habitude chez les Abeilles orphelines, qui ne reçoivent que du sucre.

C. — Matériel et méthode pour apprécier l'inhibition de la construction des cellules royales

La méthode d'appréciation de l'inhibition de la construction des cellules royales est une modification de la technique utilisée par BUTLER. Elle consiste à faire entreprendre à des ouvrières orphelines un élevage royal en les forçant à consommer des substances supposées inhibitrices de la construction.

150 à 200 ouvrières sont prises au hasard dans une ruche, sur un cadre de couvain. Elles sont immédiatement encagées, après avoir été très légèrement endormies au gaz carbonique.

Les cagettes utilisées sont d'un type spécial : elles mesurent 10 cm, 5 de haut, sur 8 cm de long et 5 cm de profondeur. Elles se composent d'un socle en bois et d'un couvercle en verre, réunis l'un à l'autre par deux rectangles en bois solidement fixés au socle. Elles sont fermées par deux grillages en crin nylon de 2,28 mm de mailles, qui permet une bonne aération de l'intérieur de la cagette.

Par l'un des orifices ménagés à la base d'un des rectangles, on introduit une mangeoire en zinc de 2,7 cm de large sur 4,5 cm de long, pouvant contenir le candi et le pollen, que les Abeilles reçoivent le jour même de leur encagement. Par l'autre orifice, on introduit un abreuvoir en verre du même type que ceux que nous avons décrits et contenant de l'eau.

Le lendemain, on fixe au couvercle en verre un morceau de *cire claire* bâtie, contenant des œufs ; car les ouvrières ne construisent pas de cellules royales sur des cires foncées. SHINIEVA, (1953), avait aussi remarqué que les Abeilles sélectionnaient les larves de reine de préférence sur les rayons clairs. Le morceau de cire est

ensuite introduit directement, par le toit de la cagette, au sein de la petite population. On obtient des ébauches royales au bout de vingt-quatre à quarante-huit heures, selon l'âge des œufs prélevés (photos 11 et 12).

Nous utilisons, au début, pour ce test, de jeunes Abeilles écloses à l'étuve ; mais cette méthode ne donne pas de résultats satisfaisants : l'apparition des ébauches royales est plus tardive (4 jours plus tard, au lieu d'1 à 2 jours). Cette différence tient probablement au fait que les Abeilles n'étaient pas encore aptes à sécréter des écailles de cire. Cependant, lorsqu'on utilise un nombre de jeunes Abeilles supérieur à 200 : 300 par exemple, on obtient la construction de cellules royales. Il semble bien qu'il existe un nombre déterminé d'Abeilles au-dessous duquel il ne peut y avoir formation de cellules royales. Nous l'avons évalué à une vingtaine d'Abeilles adultes ; mais il est possible que ce nombre varie selon l'état des Abeilles prélevées, et selon la saison.

Si l'on fixe sur le morceau de rayon, contenant des œufs, les corps de deux ouvrières fraîchement tuées (en provenance des cagettes), enduits d'une solution éthérée de phéromone 1, puis de sirop miellé très concentré, alors les cellules royales n'apparaissent pas.

La phéromone I, inhibitrice de la construction des cellules royales, n'est pas attractive. C'est pourquoi il est indispensable d'y ajouter quelques traces de miel si l'on veut que les Abeilles viennent la prélever, tout comme elles le font sur le corps des reines, vivantes ou mortes.

CHAPITRE III

LOCALISATION DE LA PHÉRORMONE

A. — Mise en évidence de l'existence de la phéromone.

Dès 1953 j'ai constaté qu'une reine féconde, morte naturellement deux jours après son introduction dans une cagette d'expérience, continuait à « intéresser » les jeunes Abeilles. Les ouvrières qui l'entouraient présentaient une attitude caractéristique : quelques-unes s'immobilisaient et cherchaient à entrer, au moyen des antennes, au contact des téguments royaux, puis se mettaient ensuite à lécher la reine avec avidité. D'autres étiraient immédiatement leur proboscis.

Je poursuivis l'expérience en laissant cette reine dans la cagette expérimentale, peuplée environ d'une centaine d'ouvrières âgées de deux jours. Celles-ci avaient déjà reçu pour nourriture, dès le premier jour de leur encagement, du candi, de l'eau et du pollen frais. Au bout de dix-sept jours, je disséquai les ovaires des ouvrières et constatai que, bien qu'elles aient reçu du pollen frais tout au long de l'expérience, leurs ovaires restaient rudimentaires par rapport à ceux des ouvrières orphelines témoins, qui contenaient des œufs.

J'ai reproduit l'expérience en présence de nouvelles ouvrières. Elle s'occupèrent encore de la reine pendant plus de sept jours.

J'ai alors examiné un certain nombre de reines et comparé les pourcentages d'Abeilles ovigères chez les ouvrières accompagnées d'une reine et chez les ouvrières témoins, privées de reine.

MÉTHODE

Les différentes reines examinées étaient introduites, au début de l'expérience, soit mortes, soit vivantes, dans des cagettes peuplées de jeunes Abeilles. Dans le dernier cas, elles étaient tuées par différents procédés, quelques heures après leur introduction, ou au bout d'un, deux, trois ou quatre jours. Quelques-unes moururent naturellement au bout d'un à deux ou trois jours de séjour au milieu des jeunes Abeilles. Elles étaient alors laissées dans les cagettes jusqu'à la fin de l'expérience. Ces reines provenaient, pour une petite partie, des ruches du laboratoire ; mais surtout d'expéditions d'éleveurs et d'apiculteurs. C'est pourquoi, dans la plupart des cas, il m'a été impossible de connaître exactement leur âge et leur origine. C'étaient en général des reines de rebut, de plus de deux ans, et de mauvaises ponduses. Les reines mortes, à leur arrivée, étaient mises en expérience immédiatement, ou conservées à 0 °C. Les reines vivantes étaient, soit mises en expérience, le jour même, soit conservées à l'étuve en présence d'une centaine d'ouvrières. Dans quelques cas où

l'on manqua de couvain naissant, elles furent conservées à l'étuve en présence d'une dizaine d'Abeilles, ou bien tuées, puis conservées à 0 °C.

Les cagettes avec leur reine étaient examinées chaque jour et l'on notait spécialement le pouvoir d'attraction des reines, laissées au contact des ouvrières pendant toute la durée de l'expérience. *Nous avons pu mettre en évidence, de cette façon, le fait que certaines reines étaient plus inhibitrices que d'autres.* L'expérience durait un minimum de quinze jours, au bout desquels 15 ouvrières étaient prélevées au hasard, endormies au gaz carbonique, tuées et disséquées. L'état de leurs ovaires était alors examiné et les différents stades observés, classés selon la technique de HESS, que nous avons déjà exposée au début de ce travail (Voir chapitre II : *Matériel et méthodes de travail*).

Nous avons exposé les résultats dans le tableau n° 1.

Sur 46 expériences correspondant à 32 reines examinées, presque toutes étaient des reines fécondées, 6 seulement étaient des reines vierges. Nous avons noté, dans la troisième colonne du tableau, les différents procédés utilisés pour tuer les reines. Certaines ont été exposées au froid, à 0°C, pendant une heure et plus ; d'autres auto-clavées pendant le même temps. Quelques-unes ont été tuées par le chloroforme et d'autres par sectionnement du corps en plusieurs tronçons : tête, tête et thorax réunis, thorax, thorax et abdomen, abdomen seul.

De ce tableau il ressort *qu'un cadavre de reine attractif a toujours inhibé le développement des œufs chez des jeunes ouvrières d'Abeilles.* Si l'on considère que les ovaires sont peu développés lorsque les pourcentages d'Abeilles ovigères ne dépassent pas 33,3 p. 100 alors que les pourcentages des témoins oscillent entre 50 et 100 p. 100 (sauf dans trois cas où les témoins correspondant aux reines 11 présentent 46,6 p. 100 d'Abeilles ovigères ; 20 : 48 p. 100 ; 30 : 40 p. 100), *on obtient 30 résultats en dessous du pourcentage limite*, allant de 0 p. 100 à 33,3 p. 100, ce qui indique que les ovaires des ouvrières ne contiennent pas ou très peu d'œufs, alors que les pourcentages des témoins sans cadavre de reine varient de 40 à 82,35 p. 100 ; *et 16 résultats au-dessus du pourcentage limite* allant de 40 à 99,9 p. 100, alors que les pourcentages des témoins correspondants vont de 52,63 p. 100 à 100 p. 100.

(Ces derniers résultats positifs peuvent s'expliquer. Nous y reviendrons par la suite).

Au début de ce travail, nous avons pensé que les reines qui n'étaient tuées que trois ou quatre jours après leur introduction dans les cagettes pouvaient inhiber plus complètement le développement des œufs chez les ouvrières que celles qui y étaient introduites déjà mortes ; il nous semblait que la distribution de substance royale devait être plus forte, du fait que la reine en sécrète au cours de sa vie et que cette sécrétion est stoppée après sa mort.

Or, d'après les résultats obtenus, il ne paraît pas que les reines, introduites mortes dans les cagettes, inhibent moins le développement des œufs que lorsqu'on les a laissées en vie pendant 1 à 4 jours : l'inhibition de l'ovogénèse varie de 0 à 33,3 p. 100, lorsque les reines ont été introduites mortes, et de 0 à 26,6 p. 100, lorsque les reines ont vécu quelques jours. Citons pour exemples les expériences 1 et 4, où les deux reines sont fécondées. La première a été introduite vivante et a été tuée au bout de deux jours. La deuxième a été introduite morte au commencement de l'expérience. Dans les deux cas, les pourcentages sont très faibles : de 0 à 26,6 p. 100 d'Abeilles ovigères.

TABLEAU I

Nos des reines	Nature des reines	Moyens utilisés pour tuer les reines	Mort des reines	Nbre d'Abeilles engagées et leur âge au début de l'expérience		Durée de nourrissage en pollen frais	% d'Abeilles ovigères en présence des reines mortes	% d'Abeilles ovigères chez les Témoins
						jours	%	%
1	Reine fécondée entière.	Mort naturelle.	2 j. après le début expérience.	100	Abeilles de 1 jour	19	0	65
2	—	—	1 ^{er} jour de l'expérience.	80	— 1 —	15	20	82,35
3	—	—	3 j. après le début expérience.	30	— 1 —	19	94,7	73,3
4	—	—	Introduite morte.	35	— 2 —	19	26,6	78,5
5	—	—	—	70	— 2 —	16	26,6	60
6	—	—	—	60	— 2 —	14	33,3	60
7	Reine vierge entière.	—	Le jour de l'expérience.	30	— 3 —	16	99,9	80
8	Reine fécondée entière.	?	Introduite morte.	35	— 1 —	17	25	75
9	—	—	—	55	— 2 —	15	40	60
10	—	—	—	35	— 2 —	15	26,6	60
11	—	—	—	100	— 2 —	14	10	46,6
12	—	—	—	30	— 1 —	13	15,3	80
13	—	Tuée par les ouvrières.	—	30	— 1 —	15	26,6	73,3
14	—	Tuée par le transport.	—	155	— 1 —	15	0	65
15	Reine vierge entière.	Décapitation.	1 j. après le début expérience.	50	— 1 —	15	0	66,6
16	Reine fécondée entière.	Tête broyée.	Le jour de l'expérience.	30	— 1 —	13	20	67,8
17	Reine vierge entière.	0°C pendant 45 mn.	2 j. après le début expérience.	32	— 1 —	19	18,18	50
18	Reine fécondée entière.	0°C pendant 1 h 30.	Introduite morte.	50	— 2 —	16	20	67,8
19	—	Autoclave pdt 1 h 40.	2 j. après le début expérience.	32	— 1 —	19	26,6	50
20	Reine vierge entière.	— 2 h.	4 j. après le début expérience.	30	— 1 —	17	16	48
21	Reine fécondée entière.	— 1 h.	3 j. après le début expérience.	30	— 1 —	21	24	100
22	—	Chloroforme.	1 ^{er} jour de l'expérience.	30	— 3 —	13	85	73,3
23	— abdomen.	—	3 j. après le début expérience.	30	— 1 —	19	80	54,5
24	Reine vierge	Section.	3 j. après le début expérience.	25	— 1 —	17	53,3	66,6
25 (1)	Reine fécondée	—	Le jour de l'expérience.	30	— 1 —	13	66,6	66,6
(2)	— tête-thorax.	Tuée par les ouvrières.	Introduite morte.	30	— 1 —	13	69,2	—
(3)	— tête-thorax.	—	—	30	— 1 —	13	7,69	80
(3)	— thorax.	—	—	30	— 1 —	19	8,33	70
26	Reine fécondée tête.	—	—	30	— 1 —	19	41,66	80
— thorax.	Tuée par les ouvrières.	Introduite morte.	—	30	— 1 —	18	28,57	—
— abdomen.	—	—	—	30	— 1 —	18	58,3	66,6
27	Reine fécondée tête.	Tuée par les ouvrières.	Introduite morte.	53	— 1 —	16	13,3	—
— thorax.	—	—	—	53	— 1 —	16	53,3	60
— abdomen.	—	—	—	53	— 1 —	16	26,6	—
28 (1)	Reine fécondée tête.	Tuée par les ouvrières.	Introduite morte.	50	— 2 —	18	26,6	—
— thorax-abdomen.	—	—	—	50	— 2 —	18	26,6	—
(2)	— tête.	—	—	55	— 2 —	16	13,3	52,53
— thorax-abdomen.	—	—	—	55	— 2 —	16	53,3	—
29	Reine vierge tête.	Tuée par les ouvrières.	Introduite morte.	55	— 2 —	16	20	78,5
— thorax-abdomen.	—	—	—	55	— 1 —	18	53,3	—
30	Reine fécondée tête.	Mort naturelle.	Introduite morte.	55	— 1 —	18	0	40
— thorax-abdomen.	—	—	—	50	— 2 —	22	26,6	—
31	Reine fécondée tête.	Mort naturelle.	Introduite morte.	50	— 2 —	22	20	66,6
— thorax.	—	—	—	53	— 1 —	16	20	—
— abdomen.	—	—	—	53	— 1 —	16	20	—
32	Reine fécondée tête.	Mort naturelle.	Introduite morte.	53	— 1 —	16	26,6	80
— thorax.	—	—	—	55	— 3 —	16	80	—
— abdomen.	—	—	—	55	— 3 —	16	80	—
				55	— 3 —	16	86,6	—

Nous exposerons d'ailleurs plus en détail, au chapitre VII, l'importance de la trophallaxie entre reine vivante et ouvrières, lorsqu'elles sont séparées par un obstacle permettant seulement des échanges de nourriture, mais rendant tout léchage impossible. Nous comparerons également l'inhibition ovarienne obtenue chez de nouvelles ouvrières, lorsque celles-ci ne peuvent plus nourrir cette reine, mais seulement lécher son cadavre.

De ces premières expériences, nous avons tiré les conclusions suivantes :

1° *Un cadavre de reine féconde attire les ouvrières aussi fortement qu'un cadavre de reine vierge*, à condition, comme nous le verrons un peu plus loin, que les vierges aient été au contact, durant leur vivant, d'un certain nombre d'ouvrières. Les ovaires des ouvrières ne peuvent alors former des œufs, bien qu'elles consomment du pollen frais tout au long de l'expérience. Il convient de noter ici que les reines vierges étudiées étaient d'origine inconnue et par conséquent d'âge indéterminé (tableau 2).

TABLEAU 2

N° des ♀ vierges	Moyens utilisés pour tuer les reines	% d'abeilles ovigères	N° des ♀ fécondes	Moyens utilisés pour tuer les reines	% d'abeilles ovigères
15	Tête broyée (♀ entière)	20 %	14	Décapitation (♀ entière)	0 %
17	0 °C pendant 1 h 30	20 %	16	0 °C pendant 45 mn	18,18 %
20	Autoclave pendant 1 h	24 %	18	Autoclave pendant 1 h 40	26,6 %
29	Décapitation (tête)	20 %	28	Décapitation (tête)	26,6 %

De même les ovaires des ouvrières ne forment pas d'œufs en présence d'une reine vivante attractive, *qu'elle soit vierge ou féconde*.

2° Cependant, si l'on tient compte du résultat obtenu dans l'expérience 7, où une reine nouvellement née a été offerte aux ouvrières, on est amené à penser que *toutes les reines vierges ne sont pas inhibitrices*.

En effet, dans ce cas, la reine n'a pas attiré les ouvrières et 99,9 p. 100 d'entre elles se sont transformées en ouvrières pondeuses. Née le 28 juin 1954, elle fut mise en présence de sept ouvrières et mourut le lendemain. Dans les expériences, 15, 17 et 20, les reines vierges ont été soignées par un groupe plus important d'ouvrières (expérience 20 : 100 ouvrières), pendant dix, onze et vingt-et-un jours.

Ces résultats nous amènent à reconnaître *l'importance du nombre des ouvrières qui doivent être en contact direct avec la reine, dès la naissance de celle-ci*, pour qu'apparaisse la « substance inhibitrice ». Nous avons repris cette question en étudiant systématiquement l'apparition du pouvoir d'attraction chez des reines vierges, en fonction de leur âge et du nombre d'ouvrières mises en leur présence (voir chapitre VI).

3° Il n'y a pas de différence dans l'inhibition de l'ovogénèse chez les ouvrières, lorsqu'on leur a présenté des reines tuées par le froid à 0°C, ou par la vapeur d'un autoclave (expériences 16 à 20). Les pourcentages oscillent seulement entre 16 et 26,6 p. 100. Ce fait nous a permis de conclure que *la substance royale attractive et inhibitrice était stable, tout au moins sous la forme brute* qui se rencontre sur le cadavre des reines.

4° D'autre part, les reines n° 21 et 22, tuées au chloroforme, n'inhibent pas le développement des œufs, puisque le pourcentage d'Abeilles ovigères atteint, dans un

cas, 85 p. 100 et, dans l'autre, 80 p. 100. Il s'agit encore dans ce cas de reines conservées en étuve pendant plus d'un mois en présence de très peu d'Abeilles (10 au maximum). En outre, les téguments de ces deux reines ont été au contact des parois d'un tube de verre souillé par le chloroforme. Nous avions pensé que la « substance inhibitrice », qui semble s'accumuler dans les téguments extérieurs, a été en partie dissoute par le solvant. Il s'est révélé par la suite qu'il pouvait effectivement l'extraire, ainsi que quelques autres : benzène, éther, acétone, alcool bouillant.

Dans le cas de la reine n° 3, où l'on note 94,7 p. 100 d'Abeilles ouvrières, les ouvrières ne se sont absolument pas intéressées à leur reine. Elle avait été maintenue pourtant en vie, à l'étuve, en présence d'une dizaine d'Abeilles, pendant deux mois. Ces faits sont en rapport avec ce que nous avons observé chez des reines vierges, à savoir que le nombre d'ouvrières joue non seulement un rôle important dans l'apparition de la « substance attractive », mais doit aussi en avoir un sur le maintien de ce pouvoir chez les reines fécondes. Cela s'accorderait assez bien avec ce que les apiculteurs ont déjà remarqué : une reine confinée dans un espace clos, en contact pendant plusieurs jours avec un nombre limité d'Abeilles (dans les expéditions par la poste), ne reprend pas toujours sa ponte immédiatement, et son acceptation dans la nouvelle ruche est plus délicate. Il est probable que la sécrétion de sa « substance attractive » diminue fortement ou même se trouve stoppée dans ce cas.

Dans l'exemple de la reine n° 9, très peu attractive, celle-ci nous avait été expédiée par un apiculteur. Nous ne connaissions donc rien de son état physiologique : en sa présence, 40 p. 100 des Abeilles avaient des œufs dans leurs ovaires. Quant à la reine n° 32, dont nous avons examiné séparément la tête, le thorax et l'abdomen, aucun de ces segments n'a inhibé le développement des œufs : les pourcentages obtenus sont identiques à ceux des témoins. *On peut donc en conclure que toutes les reines fécondes ne sont pas inhibitrices*, qu'il existe des différences individuelles importantes quant à leur pouvoir d'attraction. Nous avons aussi signalé l'existence de telles différences chez les reines vierges.

B. — Importance de la tête dans la localisation de la phéromone.

Nous avons examiné l'inhibition de la formation des œufs chez les ouvrières engagées, lorsqu'on leur présente, non plus le cadavre d'une reine, mais *des parties de celui-ci*. Dans toutes les expériences, *la tête se révèle plus attractive et par conséquent plus inhibitrice que l'abdomen*. Par contre, les têtes d'ouvrières n'intéressent aucunement les jeunes Abeilles (tableau 3).

Chez la reine 28, il n'y a pas de différence dans le développement des œufs entre la tête, d'une part, et le thorax réuni à l'abdomen, d'autre part, ce qui correspond quand même à une bien plus forte inhibition de la tête, si l'on considère les surfaces

Nous avons observé le nombre d'ouvrières attirées par chacune des parties du corps de la reine, en effectuant des comptages plusieurs fois par jour (tableau 4).

Dans tous les cas, le nombre d'ouvrières léchant la tête d'une reine est plus grand que celui des ouvrières s'intéressant au thorax et à l'abdomen. Lorsque tête, thorax et abdomen sont nettement séparés, la tête reste encore plus attractive que le thorax, mais celui-ci l'est plus que l'abdomen.

Ces observations furent confirmées par la suite par BUTLER. En 1958, avec SIMPSON, il trouva que le contenu des glandes mandibulaires d'une reine féconde était

TABLEAU 3

N ^{os} des ♀	Nature des reines	Parties des reines offertes aux ♂	% d'Abeilles ovigères	Parties des reines offertes aux ♂	% d'Abeilles ovigères
25 (1)	Féconde	Tête + Thorax	7,69	Abdomen	69,2
(2)		Tête + Thorax	8,33		
(3)		Thorax	41,66		
26.....	Féconde	Tête	28,57	Thorax	58,3
27.....	Féconde	Thorax	13,3	Abdomen	53,3
28 (1)	Féconde	Tête	26,6	Thorax + Abdomen	26,6
(2)		Tête	13,3	Thorax + Abdomen	53,3
29.....	Vierge	Tête	20	Thorax + Abdomen	53,3
30.....	Féconde	Tête	0	Thorax + Abdomen	26,6
31 (1)	Féconde	Tête	20	Abdomen	26,6
(2)		Thorax	20		

TABLEAU 4

Reines	Tête	Thorax	Abdomen	Durée des observations
♀ f. A.....	108	105	88	3 heures
♀ f. B.....	121	100	96	3 heures
♀ f. C.....	55	40	38	1 heure 25
♀ f. D.....	40		6	10 minutes
Total	294		228	

capable d'inhiber la production d'autres reines ; et, en 1959, d'inhiber le développement des ovaires d'ouvrières orphelines. En même temps (LAVIE et PAIN, 1959), j'ai montré l'*attraction* très forte exercée par les glandes mandibulaires de reines fécondes (test sur papier-filtre), comparées aux autres organes (tube digestif, ovaires, spermathèque, glandes labiales, hypopharyngiennes, hémolymphes, cœur, cerveau). Par contre, *les glandes mandibulaires de reines vierges naissantes ne sont pas attractives*, pas plus que les trois paires de glandes céphaliques prélevées chez les ouvrières.

Les glandes mandibulaires des reines sont donc les seuls organes, à part le tégument, capables d'attirer d'une manière durable de jeunes ouvrières.

La phéromone serait répandue de là sur le tégument, soit du fait que la reine, en se nettoyant, en imprègne son corps, soit du fait qu'elle distribue de la phéromone aux ouvrières et que celles-ci, en la léchant, en régurgitent sur son tégument. Il est d'ailleurs très possible que ces deux processus entrent en jeu.

CHAPITRE IV

MODE D'ACTION DE LA PHÉRORMONE

L'observation des cagettes à l'étuve ne nous renseigne que partiellement sur le mode d'action de la « substance royale ». Les ouvrières qui sont attirées par les cadavres des reines adoptent, comme nous l'avons déjà décrit (PAIN 1954-1956), avec DOBROVSKY (1958) et VOOGD (1959) une attitude caractéristique : mouvements particuliers des antennes, étirement du proboscis sur les téguments royaux.

A. — Influence possible de divers stimuli

Les attitudes des ouvrières autour d'un cadavre de reine attractif paraissent identiques à celles que l'on observe autour des reines vivantes, excepté que, dans ce dernier cas, il s'établit en plus des activités d'ordre trophique.

Mais pour entraîner une réaction typique de la part des ouvrières, le prélèvement de la « substance royale » doit-il être associé à la perception du corps de la reine, ou bien la substance peut-elle être intégrée à n'importe quel autre support ?

C'est la question que nous nous sommes posée. Pour y répondre, nous avons présenté à des ouvrières engagées des cadavres de reines auxquels nous avons fait subir de profondes modifications.

1° Le corps d'une reine vierge (d'âge et d'origine inconnus), fraîchement morte, fut écrasé et présenté ensuite à une trentaine de jeunes Abeilles d'un jour. Celles-ci s'intéressèrent à ses restes pendant plus de dix jours, et, lors de la dissection de leurs ovaires, 20 p. 100 seulement de ceux-ci contenaient des œufs, alors que chez les témoins l'on enregistrait 66,6 p. 100 d'Abeilles ovigères.

2° Le corps d'une reine féconde fut découpé en morceaux et ceux-ci présentés dans une coupelle à 30 ouvrières de deux jours. Celles-ci leur portèrent de l'intérêt, alors qu'elles ne firent jamais attention à des morceaux d'ouvrières présentés de la même façon. Au bout de 15 jours les ovaires des ouvrières témoins formèrent des œufs : 77,7 p. 100, alors que ceux des ouvrières qui avaient reçu une reine en formèrent beaucoup moins : 35 p. 100 d'Abeilles ovigères.

3° Une reine féconde de collection, conservée depuis trois ans, fut réduite en poudre, et la poudre offerte dans un sachet de soie à de jeunes Abeilles. Les ouvrières se groupèrent immédiatement autour du sachet et ne le quittèrent plus jusqu'à la fin de l'expérience. Les témoins, par contre, n'allèrent jamais sur un sachet de même dimension, bourré de papier-filtre, ou bien encore de poudre de mâles. Nous avons obtenu, dans le premier cas, en présence de la reine, 14,20 p. 100 d'Abeilles ovigères et, dans le deuxième cas, en présence du sachet ne contenant que du papier, 50 p. 100.

4° Des morceaux de moelle de sureau furent imbibés d'une solution de chloroforme, dans laquelle avait séjourné pendant vingt-quatre heures le corps d'une reine féconde, et, dans une solution témoin, le corps d'une ouvrière d'un jour. Seuls les morceaux de sureau imbibés d'extrait de reine, présentés à de jeunes Abeilles enca-gées, furent entourés par celles-ci, dès les premières minutes. Les résultats furent identiques aux précédents : peu d'Abeilles développèrent des œufs en présence des supports humectés d'extraits de reine : 12,5 p. 100. En présence de l'extrait d'ouvrières, les pourcentages d'Abeilles ovigères étaient nettement plus élevés : 57,25 p. 100.

Dans un autre essai, des morceaux de sureau, préparés de la même façon et très attractifs, furent en grillagés de manière que les Abeilles ne puissent venir les sucer. Dans ce cas, les ovaires des ouvrières formèrent autant d'œufs que les ovaires des témoins (50 p. 100). En fin d'expérience, dès qu'on retira la protection en toile métallique, ces morceaux de sureau attirèrent encore de nouvelles ouvrières. Mais, dès qu'elle fut replacée, les ouvrières s'éparpillèrent au hasard dans la cagette.

La perception de *la forme de la reine* ne joue donc absolument pas dans le comportement des ouvrières. Il s'agit surtout d'une *chimioréception de contact* au sens de DETHIER (1948) ; car les Abeilles ne réagissent activement qu'en présence de la sécrétion odorante produite par la reine, ou en face d'un support quelconque, imbibé d'un extrait de reine retenant suffisamment longtemps l'odeur de celle-ci ; *mais à condition que les ouvrières en aient l'accès immédiat.*

B. — Le mode d'action de la phéromone : voie périphérique sensorielle.

Dans une note publiée par VOOGD (1956), l'auteur s'étonnait de ne pas obtenir d'inhibition ovarienne, lorsqu'elle présentait à des jeunes Abeilles la « substance royale » mélangée à la nourriture. Elle en avait conclu que cette substance devait être appliquée sur le corps d'une ouvrière morte pour qu'apparaisse le comportement typique des ouvrières vis-à-vis d'un ersatz de reine et pour quelles ne puissent plus former d'œufs dans leurs ovaires. Or, dans un travail précédent, VOOGD (1955) avait indiqué pourtant que le comportement caractéristique des ouvrières avait été obtenu à l'aide d'extraits de reines imprégnant des morceaux de bois. Par conséquent, une stimulation annexe, induite par le corps même de l'Abeille, ne paraissait pas nécessaire d'après VOOGD elle-même.

La non efficacité de la substance, mélangée à la nourriture, dans les expériences de VOOGD, nous paraît pouvoir s'expliquer assez facilement. Après avoir modifié notre première conception sur ce sujet (PAIN, 1954) nous avons proposé l'hypothèse suivante (CHAUVIN et PAIN, 1956) : ayant remarqué que les Abeilles auxquelles on présente la substance attractive cherchent à entrer avec elle en contact antennaire, nous en avons conclu qu'il est très probable que la stimulation antennaire est différente, sinon absente, lorsque les Abeilles absorbent la substance mélangée à la nourriture. La stimulation antennaire, se joignant à l'ingestion de la substance, serait indispensable à l'obtention du phénomène.

A la suite de nos suggestions, VOOGD fit sienne l'hypothèse que nous venons d'exposer. En 1959, elle anesthésia de jeunes Abeilles auxquelles elle amputa les antennes, ou les entoura de tubes de verre, de paraffine ou d'une colle plastique. Ces Abeilles ne s'intéressèrent jamais à la reine. Ainsi se trouva vérifiée notre hypothèse :

celle du rôle primordial joué par les antennes, nécessaire pour induire chez l'ouvrière son comportement de « cour ».

Elle répéta, d'autre part, les expériences de 1956 et obtint des résultats identiques, à savoir que, lorsque des extraits de 10 reines sont mélangés à 10 grammes ou plus de nourriture composée de sucre et de caséine (5 p. 100), les ovaires des ouvrières contiennent des œufs, malgré la dose considérable de phéromone présente. Lorsque ces extraits sont incorporés à du sucre candi, il faut, pour obtenir l'inhibition, augmenter encore le taux relatif de la phéromone, avec la même quantité d'extrait royal, en diminuant la proportion de nourriture (candi) au-dessous de 2,5 grammes.

Mais, en 1954, BUTLER obtint l'inhibition des œufs chez des ouvrières, en mélangeant seulement à leur nourriture le contenu stomacal de plusieurs de leurs congénères, qui, elles, avaient léché une reine (il n'indique pas de quel ordre est cette inhibition par rapport aux témoins, ni la concentration en substance royale des aliments.)

En 1956, CARLISLE et BUTLER notèrent une inhibition des œufs, en mélangeant à la nourriture d'ouvrières le contenu des glandes à sinus des pédoncules oculaires de plusieurs crevettes femelles (*Leander serratus*) : (15 Abeilles ovigères sur 32, contre 30 sur 34 chez les témoins). Nous signalerons à ce sujet que des broyats de pédoncules oculaires de Crabes (*Portunio et Cancer*), déposés sur des papiers-filtres, n'attirèrent jamais les ouvrières d'Abeilles.

En 1957, BUTLER retrouva les mêmes résultats en mélangeant à la nourriture d'ouvrières engagées l'extrait acétonique d'une reine (69 p. 100 pour 91 p. 100 chez les témoins). Il n'indique pas la quantité, en mgr, du mélange pollen-candi utilisé.

En 1958, BUTLER et GIBBONS démontrèrent qu'un extrait de reine, incorporé à l'eau d'un nourrisseur, empêche la construction de cellules royales dans des groupes d'Abeilles orphelines. Mais nous nous demandons quelle valeur attribuer à ces résultats, étant donné qu'à la température à laquelle opère BUTLER (32°C) la consommation en eau pure est très faible. Nous l'avons observé au cours de nos expériences portant sur le pouvoir d'attraction ; car les Abeilles qui servirent à ce test vécutent à cette température pendant plus de cinq jours, sans recevoir d'eau. Il en est de même pour les ouvrières adultes, qui résistent plus longtemps encore à la privation d'eau.

D'après les faits qui viennent d'être exposés, il est probable, contrairement à la conclusion de VOOGD, que l'ingestion de substance royale non purifiée agit sur le tractus génital de l'ouvrière. Mais la quantité d'extrait de reine doit être importante (comme l'a calculé VOOGD) et imprégner fortement de son odeur la nourriture offerte aux ouvrières, pour présenter un effet inhibiteur. Butler ne paraît pas avoir songé à l'importance du comportement des ouvrières en présence de la phéromone attractive.

Au début de ce travail, nous n'avons pas utilisé cette technique, parce qu'elle s'éloignait trop des conditions naturelles de prélèvement de la phéromone.

Nos expériences des papiers-filtres attractifs et inhibiteurs du développement des œufs dans les ovaires des ouvrières et le fait que la phéromone I, non attractive, n'inhibe pas ce développement (voir chapitre v), nous fait supposer que, pour obtenir l'inhibition maximum, la substance attractive doit être offerte séparée des aliments, de manière qu'il s'établisse une excitation antennaire, sans laquelle il ne semble pas qu'il puisse y avoir action complète de la phéromone. Nous avons obtenu un retard très net de l'ovogénèse (stades 3) comparé aux témoins (stades 4,5) en présentant pendant 18 jours, un papier imbibé de 0,50 mg de phéromone I associée à 0,1 mg de phéromone II.

Ainsi donc la stimulation serait d'ordre périphérique à point de départ sensoriel : antennes.

L'opinion de VOOGD (1959) est que, durant le léchage de la reine, les ouvrières n'ingèrent pas la phéromone, mais s'imprègnent seulement de son odeur. Pour elle, l'ingestion n'est pas un aspect important du mécanisme inhibiteur de la substance. Ce n'est pas ce que nous avons observé, en utilisant des ouvrières mortes, qui avaient préalablement léché des papiers imbibés de la substance royale ; car celles-ci demeurèrent inattractives.

CHAPITRE V

NATURE CHIMIQUE DE LA PHÉRORMONE

Au cours de ces quatre dernières années, et avec la collaboration de BARBIER, nous avons cherché à isoler et à identifier les substances responsables des trois activités actuellement connues de la phérormone :

- 1° pouvoir d'attraction sur de jeunes Abeilles ;
- 2° inhibition du développement de leurs ovaires ;
- 3° inhibition de la construction des cellules royales.

Après avoir vérifié le pouvoir d'attraction de cellules de papiers-filtres, sur lesquels on a déposé quelques gouttes d'extraits bruts alcooliques, acétoniques, étherés ou chloroformiques de reines, BARBIER a entrepris sur eux, ainsi que sur des jus alcooliques de reines en provenance d'Amérique, toute une série de fractionnements, sous la direction du professeur LEDERER.

Les reines d'Abeilles ont été broyées, puis extraites, soit par l'éthanol, soit par le butanol tertiaire. Les extraits bruts ont été séparés en fractions solubles et insolubles dans l'acétone ; puis la fraction soluble dans l'acétone, mise en suspension dans un peu d'eau à pH 2, est extraite successivement par le pentane, l'éther et le chloroforme. Chaque phase organique est ensuite séparée en acides et en neutres par le carbonate de sodium 2 N (BARBIER et SCHINDLER, 1959).

Les figures 2 et 3 donnent un résumé d'ensemble de ces recherches. Les fractions obtenues ont été examinées du point de vue de leur pouvoir d'attraction sur de jeunes ouvrières encagées.

Nous avons figuré par les signes ++ et + les extraits très attractifs (plus de 10 Abeilles attirées pendant cinq minutes) et les extraits attractifs (de 5 à 9 Abeilles attirées pendant le même temps) et par les signes +— et — les extraits peu attractifs (de 1 à 4 Abeilles) ou inattractifs.

Du premier schéma il ressort que ce sont les *acides obtenus du pentane* qui sont responsables du pouvoir d'attraction et de l'activité inhibitrice. On note une attraction résiduelle correspondant à la fraction acide de l'éther. Les fractions neutres du pentane, de l'éther, et du chloroforme n'intéressent nullement les ouvrières.

La fraction acide intéressante a été distillée entre 20° et 180°. La fraction active, obtenue du distillat entre 20° et 110° a été scindée en trois, par une nouvelle extraction, par le carbonate acide de potassium 2 N ; puis par le carbonate de sodium 2 N. Seuls les acides passant dans le carbonate sont attractifs. Ils ont été chromatographiés sur colonne d'acide silicique et sur papier (chromatographie de partage). Cette fraction active se présente à 20° sous forme d'une huile incolore se figeant vers 10° et possédant une odeur très particulière, difficile à définir.

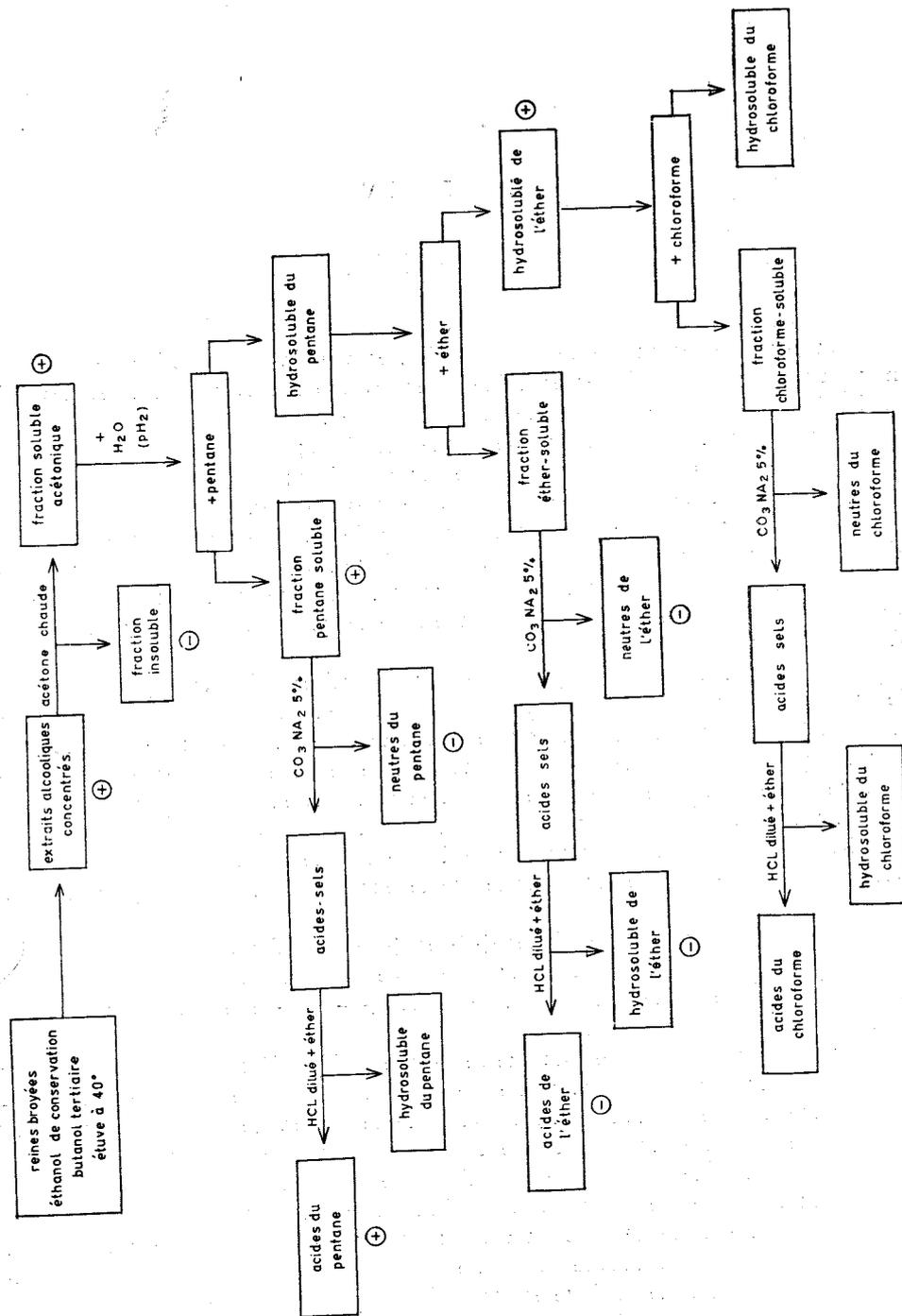


FIG. 2 — Recherche de la fraction attractive royale :
Fractionnement par le pentane, l'éther, le chloroforme.

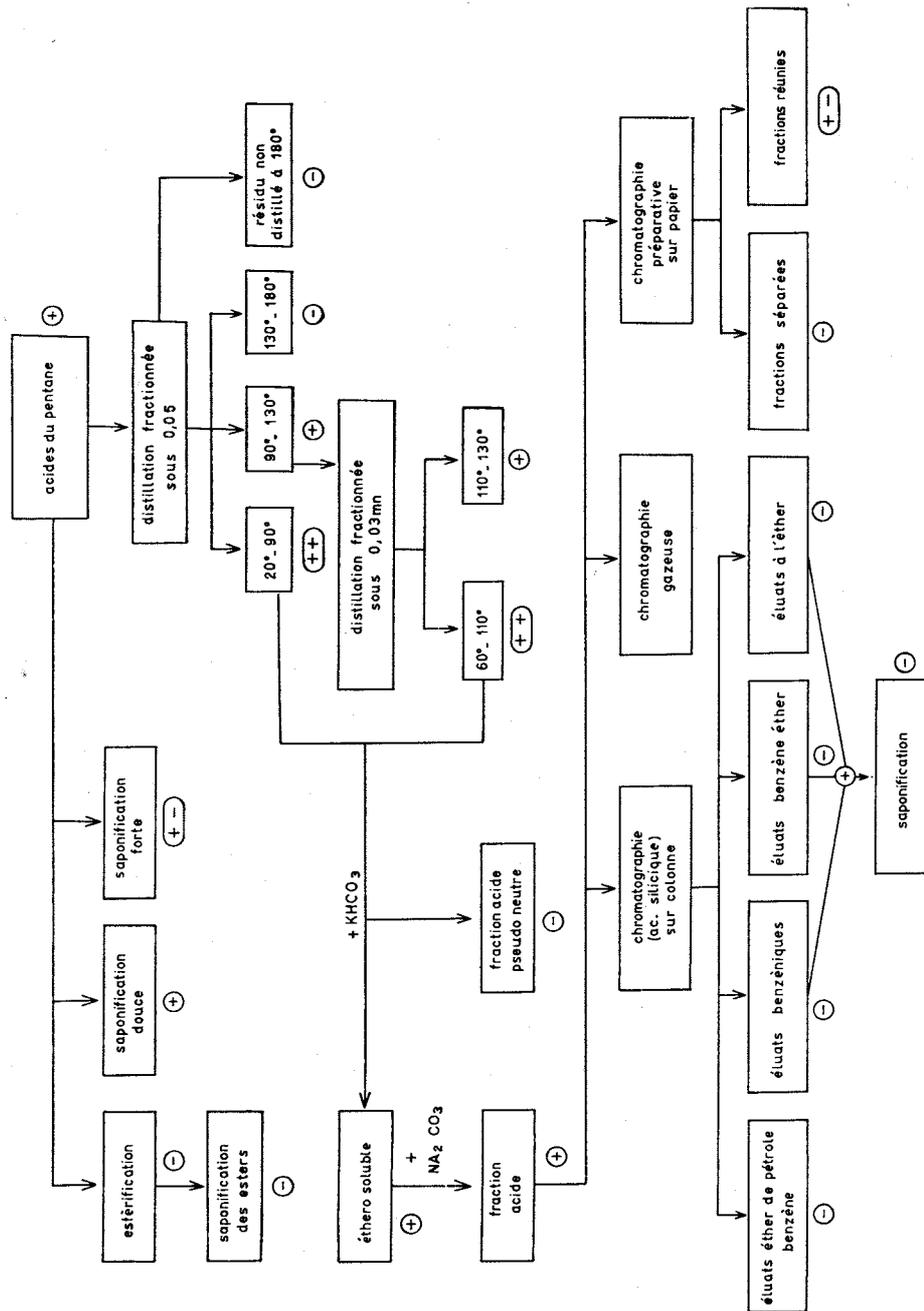


FIG. 3 — Purification de la fraction attractive :
acides du pentane, par distillation fractionnée et chromatographie.

A. — Résultats obtenus par chromatographie sur colonne et sur papier.

Toutes les fractions recueillies par ces deux procédés sont inactives. Cependant il est possible de reconstituer la fraction attractive par le mélange des éluats benzène, benzène-éther et éther de la chromatographie sur colonne, ou les éluats des zones de RF, compris entre 0,5 et 1 de la chromatographie sur papier (système chloroforme-formamide).

La substance responsable de l'attraction n'est donc pas un corps pur, mais un mélange de substances acides.

Ce mélange est également capable d'inhiber la formation des œufs dans les ovaires de jeunes Abeilles engagées ; mais il n'a pas encore été possible de montrer que ces deux phénomènes dépendaient des mêmes substances :

La fraction attractive correspondant au mélange des éluats (benzène, benzène-éther, éther) a été présentée, déposée sur du papier-filtre, à des ouvrières nourries abondamment de candi et de pollen (lyophilisé) et recevant en plus de l'eau.

L'un des papiers-filtres reçut une quantité de substance correspondant à la valeur d'une reine ; l'autre une quantité égale à 50 reines. Ces papiers étaient imbibés deux fois par jour de leur solution attractive. Aux Abeilles témoins on présenta un papier imbibé seulement du solvant (éther).

Les ouvrières s'intéressèrent aux papiers imprégnés de la substance royale pendant les quinze jours que durèrent l'expérience. Le papier imbibé de l'odeur d'une seule reine était nettement moins attractif que le papier imbibé de l'extrait plus concentré.

Les dissections donnent les pourcentages suivants :

- 0 p. 100 d'ovigères chez les ouvrières nourries avec du sucre candi ;
- 66,6 p. 100 d'ovigères chez les ouvrières nourries avec du pollen et du candi ;
- 46,6 p. 100 d'ovigères chez les ouvrières nourries avec du pollen et du candi ; en présence du papier imbibé de substance (équivalent à une reine) ;
- 20 p. 100 d'ovigères chez les ouvrières nourries avec du pollen et du candi, en présence du papier imbibé de substance (équivalent à 50 reines).

Les résultats sont hautement significatifs entre les ouvrières témoins ne recevant que du pollen et celles qui reçoivent la même nourriture, avec, en plus, un papier imbibé de la substance très concentrée ($t = 3,7$ pour $v = 13$ et une probabilité $P = 0,05$.)

Nous avons examiné en fin d'expérience si les corps des ouvrières, qui avaient prélevé la phéromone sur les papiers, intéressaient de jeunes Abeilles ; mais leurs cadavres demeurèrent inattractifs.

Toutefois, en appliquant cette méthode de fractionnement à des extraits d'ouvrières non orphelines, nous avons révélé que ceux-ci étaient attractifs vis-à-vis de jeunes ouvrières ; tandis que des extraits d'ouvrières sans reine ne le sont pas. La fraction acide, extraite du pentane, ainsi que celle qui distille entre 20° et 120° sous 0,04 mm de pression, contiennent, comme les fractions correspondantes des reines, le maximum d'activité.

Les séparations ont été effectuées sur 1 kg d'Abeilles non orphelines et 1 kg d'Abeilles orphelines. La quantité totale d'acides obtenus correspond à celle que l'on pourrait obtenir de 14 reines.

La répétition de ces essais sur les ouvrières confirme que le pouvoir d'attraction est bien dû à un mélange de plusieurs substances.

Il est assez curieux de constater que les extraits bruts d'ouvrières, que nous avons examinés tout au début de l'isolement chimique, n'attirèrent jamais les ouvrières.

C'est donc que, lors de la purification chimique, on élimine un facteur encore inconnu, soit répulsif, soit peut-être inhibiteur de la phéromone attractive. Malheureusement les essais qui furent tentés pour vérifier ces hypothèses ne purent être poussés assez loin.

Ces résultats semblent montrer que la fraction attractive serait transmise aux ouvrières par la reine.

B. — Résultats obtenus par chromatographie gazeuse.

Nous avons disposé à cet effet d'un appareil Pye Argon chromatograph (W. G. Pye and Co Ltd., Cambridge, Grande-Bretagne), à chambre de détection par ionisation.

Avec cet appareil ont été analysées toutes les fractions actives isolées des reines et des ouvrières. Des quantités de substances de l'ordre de 0,3 mg, en solution dans l'éther, ont été injectées dans l'appareil, porté, soit à 150°, soit à 200°C.

Il n'est pas possible de récupérer les substances introduites dans cet appareil ; mais celui-ci inscrit automatiquement des courbes qui correspondent à la nature et à la concentration des substances contenues dans le mélange. On vérifie si ces courbes sont les mêmes que celles qu'on obtient après introduction, dans l'appareil, de substances connues (méthode du témoin interne).

Au moyen de cette technique, on note, à 200°, la présence d'un pic caractéristique, présent dans toutes les fractions actives de reines et d'ouvrières non orphelines, mais absent des fractions inactives et, en particulier, des Abeilles orphelines. Ce pic correspond à l'acide F 55°, R_F 0,85 (isolé par BARBIER en 1958), voisin de l'acide F 50° cristallisé $\alpha\beta$ -insaturé, isolé par BUTLER, CALLOW et JOHNSTON (1959) de têtes de reines fécondes. Offert à des ouvrières orphelines, l'acide F 50° inhibe la production de cellules royales, à la dose de 0,13 γ par Abeille.

D'autre part, lorsqu'on opère à température plus faible (150° au lieu de 200°), on peut mettre en évidence, dans les extraits de reines, l'existence de six pics, dont la détermination n'est pas encore tout à fait achevée.

Dans le but d'examiner plus à fond cette fraction très volatile, la fraction active des reines, déjà distillée entre 20° et 120° (sous 0,04 mm de pression) a été redistillée entre 20° et 60° (sous 0,1 mm).

Cette fraction redistillée n'est pas attractive ; mais lorsqu'on lui ajoute l'acide F 55°, elle le devient et attire fortement les ouvrières (plus de 10 Abeilles sont attirées par une tache contenant 50 γ de cet acide et 100 γ du mélange des substances volatiles). La présence de cet acide F 55°, lui-même inactif, est indispensable pour la reconstitution de l'odeur attractive.

1° ÉTUDE DE LA SÉCRÉTION DES GLANDES MANDIBULAIRES DES REINES ET DES OUVRIÈRES D'ABEILLES

A la suite des recherches de BUTLER et de SIMPSON (1958), qui montrèrent que le contenu des glandes mandibulaires de reines fécondes est capable d'inhiber la formation de cellules royales, et, après avoir constaté nous-même (1959) le fort pouvoir d'attraction de ces glandes, nous avons songé à injecter directement dans l'argon-chromatographe des extraits éthérés de glandes mandibulaires de reines et d'ouvrières.

1° Nous avons examiné séparément les glandes mandibulaires de deux reines fécondes et attractives, et les glandes mandibulaires de six ouvrières, soit naissantes, soit âgées de 14 jours, mais orphelines, soit d'âge inconnu, mais prélevées à l'intérieur de la ruche dans le cercle d'Abeilles entourant la reine.

Les glandes aussitôt disséquées sont immergées dans l'éther, puis broyées. Après filtration, on concentre les solutions, puis on prépare les esters méthyliques par action rapide d'une solution étherée de diazométhane.

On les reconcentre ensuite, avant l'injection dans l'appareil, d'environ 1 à 2 mm³.

Si l'on injecte les extraits sans estérifier par le diazométhane, on n'obtient aucun pic — ce qui indique que les substances étudiées sont des acides.

Lorsque l'on opère à 150°, on n'obtient pas de fractions volatiles en quantités détectables, tout au moins avec le nombre de glandes mandibulaires dont nous disposions.

L'examen des courbes, obtenues à 200°, permet de constater une différence fondamentale entre la sécrétion des glandes mandibulaires des reines et celle des glandes mandibulaires des ouvrières.

BARBIER (PAIN et BARBIER, 1960) a pu localiser, sur le chromatogramme correspondant aux extraits de glandes mandibulaires d'ouvrières de tous âges, un acide correspondant à celui qu'identifièrent d'abord BUTENANDT et REMBOLD (1957) puis BARKER, FOSTER, LAMB et HODGSON (1959), comme étant l'acide 10 hydroxy- Δ_2 -décénoïque, extrait par ces auteurs de la gelée royale, ainsi que des glandes mandibulaires des ouvrières adultes. Nous avons vérifié, de notre côté, que la gelée royale, ses acides gras ou l'acide de synthèse 10 hydroxy- Δ_2 -décénoïque, n'étaient pas attractifs pour les ouvrières. Sur ce même chromatogramme, il a signalé l'existence d'un pic correspondant à la position du sébaçate de méthyle. (fig. 4).

Par contre, dans les glandes mandibulaires des reines, *on ne trouve pas cet acide, mais l'acide F 55° signalé plus haut*, isolé par chromatographie préparative sur papier, à partir des fractions actives extraites des reines. Il s'apparente à l'acide F 50° isolé des têtes par BUTLER, CALLOW et JOHNSTON (1959). Nous avons trouvé que cet acide F 55° est inhibiteur de la construction des cellules royales, à la dose de 0,5 γ par Abeille. Présenté sur du papier-filtre aux doses de 40, 100 et 200 γ , il n'attire pas les ouvrières. Mélangé à 1,5 gr de pollen ou de candi en quantité très faible (0,3 mg) ou à la dose de 2,2 mg, il n'inhibe pas l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières.

Ces mêmes analyses ont permis de mettre en évidence la présence de trois autres substances, dont les esters méthyliques présentent les mêmes volumes de rétention que le sébaçate, l'azélaate et le parahydroxybenzoate de méthyle (fig. 4).

2° ÉTUDE DE LA SÉCRÉTION DES GLANDES MANDIBULAIRES DE REINES A DIFFÉRENTS STADES DE LEUR VIE

Des différences dans le pouvoir d'attraction des reines ont été remarquées en fonction de leur âge (naissantes ou âgées), de leur état (fécondes ou bourdonneuses) et selon le nombre d'ouvrières qui les nourrissent (voir chapitre VI).

On s'est demandé si ces constatations correspondaient à des teneurs variables en acide inhibiteur de la construction des ébauches royales (phéromone I) et en substances dont les esters sont plus volatils. (phéromone II)

Par la technique précédemment décrite, nous avons étudié leur production dans les glandes mandibulaires des reines d'activités et d'âges différents. Nos examens ont porté sur :

- 1° 48 glandes mandibulaires de reines naissantes.
- 2° 17 glandes mandibulaires de reines vierges, âgées de 9 et 10 jours, élevées en l'absence d'ouvrières et ne recevant qu'une nourriture sucrée.
- 3° 12 glandes mandibulaires de reines vierges âgées de 11 jours, élevées en présence d'ouvrières et nourries exclusivement au candi.

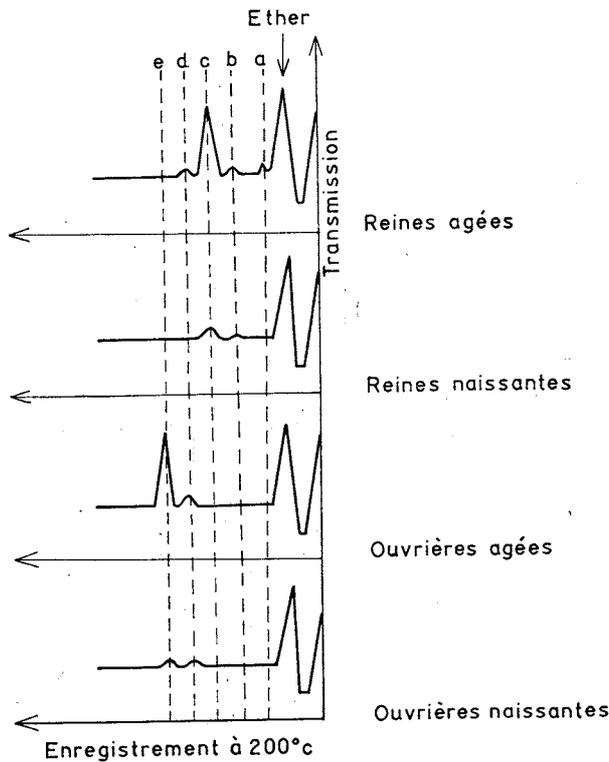


FIG. 4 — Comparaison entre les esters méthyliques de la sécrétion mandibulaire des reines et ceux de la sécrétion mandibulaire des ouvrières, en fonction de leur âge.

- a) Position du parahydroxybenzoate de méthyle.
- b) Position du l'azélate de méthyle.
- c) Cétio — 9 décène-2-trans oate de méthyle.
- d) Position du sébaçate de méthyle.
- e) Hydroxy — 10 décène-2-trans oate de méthyle.

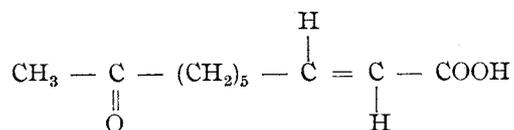
- 4° 34 glandes mandibulaires de reines fécondes âgées de 2 à 3 ans et encore en ponte.
- 5° 2 glandes mandibulaires d'une reine féconde, mais bourdonneuse.

Les analyses à 200° ont montré que l'acide inhibiteur de la construction des ébauches royales était toujours présent dans les sécrétions mandibulaires des reines ; mais à des concentrations variables, selon leur âge. Ainsi, les reines naissantes sécrètent seulement des traces de l'acide inhibiteur, alors que les reines plus âgées, vierges, fécondes ou bourdonneuses en produisent davantage. L'absence du pouvoir d'attrac-

tion des reines vierges, à leur naissance, confirme l'absence d'activité de l'acide inhibiteur de la construction des cellules royales, *lorsqu'il existe seul* dans les glandes mandibulaires des reines.

Mais les analyses effectuées à 150° montrent que *la présence, dans les glandes mandibulaires des reines, de substances dont les esters sont plus volatils, (phéromone II) est également une fonction de l'âge*, les reines naissantes en paraissant totalement dépourvues. *Ces résultats sont en accord avec les études sur l'apparition du pouvoir d'attraction signalée au chapitre VI*, et expliquent l'absence de ce pouvoir dans les glandes mandibulaires des reines naissantes. *Il semble que l'apparition de ces substances soit plus tardive que celle de l'acide inhibiteur de la construction de cellules royales. (phéromone I)* L'existence d'un pic très caractéristique mais non identifié a été mis en évidence dans les extraits de reines fécondes âgées, mais ne paraît pas exister chez les reines très jeunes. Quatre autres pics sont également décelables, et les volumes de rétention de deux d'entre eux correspondent aux volumes de rétention des phénylacétate et phénylpropionate de méthyle (PAIN, HÜGEL, et BARBIER, 1960). Ces résultats soulignent l'importance du facteur « attractif odorant » de la substance royale inhibitrice de la construction des ébauches royales.

Tout récemment, BARBIER avec LEDERER et NOMURA, (juin 1960) réalisèrent la synthèse de l'acide F 55°, en 4 étapes à partir de la cycloheptanone : ce sont des plaques blanchâtres correspondant à la formule :



et au nom d'acide céto-9 décène-2-*trans* oïque F 51-54°.

0,1 mg de cet acide suffit à inhiber la construction des cellules royales, dans une population de 150 Abeilles adultes. Utilisant ce même acide de synthèse, je n'ai jamais pu inhiber l'ovaire après ingestion (0,3 mg et 5 mg dans 1,5 gr de pollen) ou par présentation sur le corps d'ouvrières mortes (0,3 mg et 0,6 mg offerts chaque jour pendant 10 jours.)

Par une méthode analogue, BARBIER (1960) synthétisa l'acide céto-8 nonène-2 oïque F 48-51°, qui, à la concentration de 0,120 mg pour 150 Abeilles, est inactif sur l'inhibition de la construction des cellules royales.

CALLOW et JOHNSTON (1960) réalisèrent en même temps la synthèse du même acide, à partir de l'acide azélaïque ; Ainsi donc la présence d'un corps nouveau : un acide carboxylique, $\alpha\beta$ insaturé, sécrétion spécifique des glandes mandibulaires des reines d'Abeilles, est confirmée par des travaux convergents.

CONCLUSION

Étant donné leur parenté chimique, on avait émis l'hypothèse que l'acide céto-9 décène-2-*trans* oïque, substance principale des glandes mandibulaires des reines, pouvait être un produit d'oxydation ou de transformation de l'acide hydroxy-10

décène-2-trans oïque secrété par les glandes mandibulaires des ouvrières. D'après les travaux récents de WEAVER et de LAW (1960), les acides gras trouvés dans la gelée royale, y compris l'acide hydroxy-10..., contiennent tous 10 atomes de C, comme l'acide correspondant à la phéromone I. Ces auteurs concluent à une origine commune de ces composés. Nous supposons alors que les reines ne pourraient fabriquer leur phéromone I, qu'à partir d'un précurseur, présent peut-être dans la gelée royale, que leur apporteraient les nourrices, en même temps que l'acide hydroxy-10..., au cours des différentes phases de nourrissage.

CHAPITRE VI

LES OUVRIÈRES ET L'APPARITION DE LA PHÉRORMONE. LE CYCLE DE LA PHÉRORMONE.

A. — Apparition de la phérormone.

Après avoir mis en évidence (chapitre III) des différences individuelles importantes quant au pouvoir attractif et inhibiteur des reines fécondes mortes, des observations nous révélèrent qu'il existait des différences aussi grandes chez les reines non fécondées.

Des lots de reines vierges, d'âge inconnu, ont d'abord été essayés. Dans ces lots, certaines reines étaient fortement attractives ; d'autres ne l'étaient absolument pas. D'autre part des reines tuées quelques minutes après leur éclosion demeuraient inattractives.

Nous avons donc recherché à quel moment apparaît la phérormone attractive chez les reines vierges, et s'il n'existe pas d'autres facteurs, indépendants de l'âge des reines, qui puissent jouer aussi un rôle.

La méthode utilisée est la suivante :

On entreprend un élevage artificiel de reines. De très jeunes larves d'ouvrières sont « greffées » à l'intérieur de cupules artificielles en cire. Ces cupules sont transportées dans des ruchettes orphelines. Lorsque les larves ont été acceptées, c'est-à-dire lorsque les ouvrières ont commencé à étirer les bords des cellules et à y déposer un peu de gelée, elles sont alors transportées dans la partie orpheline d'une ruche normale, appelée « finisseuse ». On prélève les cellules operculées juste l'avant-dernier jour de l'éclosion des nymphes. Dans quelques cas, on a testé des reines en provenance de cellules royales naturelles, prélevées dans des ruches devenues orphelines.

Les cellules royales, au moment de l'éclosion, sont transportées au laboratoire. Elles sont détachées de leur barrette avec précaution et introduites une par une dans des cagettes Zander de $4 \times 3,5 \times 2$ cm, qui sont placées dans une étuve à 35°C , à l'intérieur de laquelle on maintient une hygrométrie suffisante.

Les naissances sont contrôlées plusieurs fois par jour à l'étuve. Nous avons pu de cette façon étudier le pouvoir d'attraction de reines vierges nouvellement écloses et de reines d'âge croissant. Parmi ces reines, certaines ont été nourries par des ouvrières, dont on a fait varier le nombre et la durée de présence auprès d'elles ; d'autres n'ont jamais été mises en présence d'ouvrières et ont dû s'alimenter elles-mêmes. Les reines, comme les ouvrières, ont vécu exclusivement avec du sucre candi.

Toutes ces reines, avant d'être testées étaient tuées par le froid, à 0°C .

Quelques-unes moururent naturellement. Lorsque les reines se nourrissaient elles-mêmes on a toujours attendu leur mort naturelle.

La variation du pouvoir d'attraction est évaluée en fonction du nombre d'ouvrières attirées par les cadavres des reines (voir les méthodes de test, chapitre II).

1° ÉTUDE DES REINES VIERGES N'AYANT JAMAIS ÉTÉ AU CONTACT D'OUVRIÈRES.

Les reines nées depuis peu sont laissées dans la cagette d'éclosion, débarrassée de la loge royale. Dès le premier jour de leur sortie, elles reçoivent une boulette de candi (mélange de miel et de sucre glace) et de l'eau. Elles peuvent vivre ainsi plusieurs jours ; mais, en général, il en est peu qui atteignent plus de 10 jours. C'est pourquoi nous n'avons guère de résultats concernant les reines âgées.

Pour l'établissement des courbes, nous avons considéré le chiffre maximum moyen d'Abeilles attirées auprès des reines, comme étant le plus représentatif du pouvoir d'attraction.

Des reines qui viennent de naître n'intéressent absolument pas les ouvrières. Leur cadavre est délaissé. Quelquefois les ouvrières mordillent leurs ailes et les transportent ainsi dans différents coins de la cagette.

Ce manque d'attraction des ouvrières pour des reines naissantes conduit à penser que celles-ci ne contiennent pas encore de phéromone. HAMMANN (1957) nota aussi « qu'il est surprenant que durant les premières heures suivant l'éclosion, les ouvrières ne fassent aucune attention à leur reine ».

Des nymphes, sorties prématurément de leur alvéole, n'intéressent pas davantage les ouvrières.

Des reines, âgées de quelques heures, à condition qu'elles n'aient pas été au contact d'ouvrières, ne les attirent pas plus qu'une reine qui vient de naître.

Des reines naissantes, en provenance d'un élevage royal, et qui ont été tuées par les Abeilles de la colonie, n'attirent pas non plus les ouvrières des cagettes d'observation.

Sur l'ensemble des reines que nous avons examinées au cours d'une saison apicole, si nous considérons que le pouvoir d'attraction, nul lorsqu'aucune Abeille n'est attirée, est faible de 1 à 2 Abeilles, il apparaît que ce n'est que vers la fin du 3^e jour que se manifesterait un début d'attraction.

Il est plus net pour des reines âgées de 6, 7 et 8 jours et encore plus pour des reines âgées de 9 à 10 jours. Cependant, il arrive que, sur l'ensemble des reines étudiées, quelques-unes attirent déjà au 2^e jour. Sur 76 reines testées à l'âge de 2 à 3 jours, 50 présentaient un pouvoir d'attraction nul, 11 un pouvoir faible, et 15 un pouvoir intéressant au moins 4 Abeilles. Par contre, sur 14 reines testées à l'âge de 9 à 10 jours, 2 seulement présentaient un pouvoir d'attraction intéressant de 5 à 6 Abeilles.

Deux reines ont pu être maintenues en vie pendant 29 jours : le pouvoir d'attraction qu'elles présentaient était très faible. Dans ces conditions, il y a peu de reines qui vivent au-delà de 13 jours.

Il semble donc qu'on puisse affirmer que des reines naissantes, âgées de quelques heures ou de 2 jours au maximum, n'attirent pas les ouvrières. Au-delà du deuxième jour, l'attraction peut apparaître chez quelques reines. Plus les reines vierges sont âgées, plus les chances sont grandes pour qu'apparaisse la substance active. *La présence des ouvrières n'est donc pas indispensable à son apparition.*

On ne peut dire si les reines qui se sont montrées attractives le seraient restées, si elles avaient pu vivre plus longtemps, puisqu'on est obligé de les tuer pour mesurer

avec précision leur pouvoir d'attraction. Il existerait cependant un moyen de l'étudier, en entourant le corps des reines d'un papier-filtre pendant un certain temps, et en présentant ensuite ce papier, imbibé de l'odeur de reine, aux ouvrières. Mais nous n'avons pas appliqué cette méthode dans cette série d'expériences.

2° ÉTUDE DE REINES MISES EN PRÉSENCE D'OUVRIÈRES.

Des reines écloses âgées d'un jour sont mises en présence d'ouvrières. Des groupes de 1, 2, 20, 60, 80, 200 à 300 jeunes Abeilles de moins de 6 jours ont été pourvus d'une reine vierge pendant des périodes de temps défini : quelques heures, 1, 2, 3, 4, 5, 10

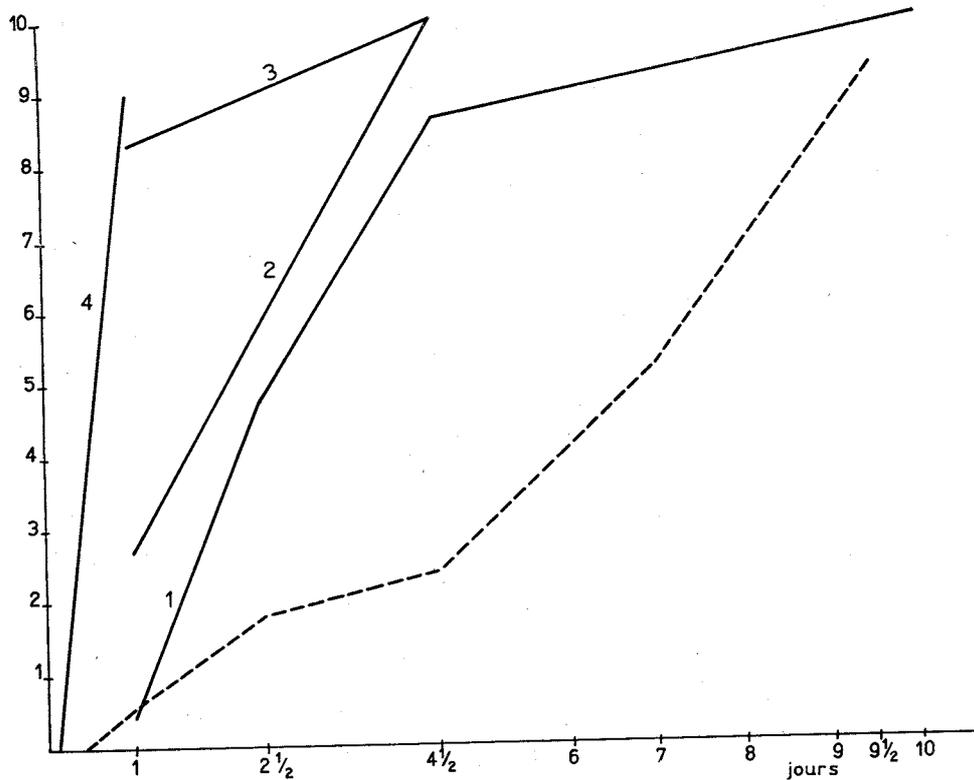


FIG 5. — Apparition du pouvoir d'attraction de reines vierges avec ou sans la présence d'ouvrières.
 (en abscisse : âges des reines)
 (en ordonnée : nombre maxima d'Abeilles attirées par les cadavres des reines.)
 (---) Reines vierges sans ouvrières.
 (—) Reines vierges avec ouvrières.
 N° 1 : 1 à 2 jeunes ouvrières
 N° 2 : 20 jeunes ouvrières
 N° 3 : 60 à 80 jeunes ouvrières
 N° 4 : 200 à 300 jeunes ouvrières.

jours. Avant d'introduire la reine parmi les ouvrières, et pour faciliter son acceptation, les Abeilles sont préalablement endormies pendant quelques minutes au gaz carbonique. De cette façon, la reine peut vivre au sein de la petite population pendant très longtemps (on a conservé ainsi des reines pendant plusieurs mois).

Nous avons exposé l'ensemble des résultats dans la figure 5.

La phéromone se manifeste au bout de 2 jours 1/2 chez des reines accompagnées d'1 à 2 Abeilles ouvrières (nombre maximum moyen d'Abeilles attirées : 4 à 5 Abeilles); mais les résultats sont plus nets au bout du 4^e jour (7 à 8 Abeilles attirées).

Nous avons calculé statistiquement la valeur de t entre différents points de la courbe. Celle-ci n'est pas significative et inférieure à 1, lorsqu'on compare le pouvoir d'attraction des reines d'1 jour, vivant seules, à celui des reines mises en présence d'1 à 2 Abeilles, pendant le même temps. Autrement dit, l'attraction n'apparaît pas plus vite lorsque les reines vivent isolées qu'accompagnées d'une Abeille, à condition que, dans ce cas, la durée de nourrissage ne dépasse pas 24 heures. Par contre, la valeur de t est supérieure à 3, lorsqu'on compare le pouvoir d'attraction des reines vivant seules pendant deux à trois jours à celui des reines mises en présence d'une à deux Abeilles pendant le même temps.

A partir de ce moment, l'attraction est nettement plus forte en présence d'une ou deux Abeilles.

Les résultats sont significatifs aussi pour des reines non accompagnées, de 4 à 5 jours (2 à 3 Abeilles attirées), par rapport aux reines ayant vécu le même temps avec une et deux Abeilles (8 à 9 Abeilles attirées).

Nous n'avons pas tenu compte des chiffres obtenus au-delà du 5^e jour, à cause de la mortalité assez tenue; mais toutes les reines testées au bout de 10 jours sont attractives, qu'elles vivent seules ou au contact d'une Abeille. Il ne semble pas qu'il y ait de différence entre leur pouvoir d'attraction. Si elle existe, il n'est pas possible de l'observer avec notre méthode. (Nous avons envisagé par la suite, avec LAVIE (LAVIE-PAIN, 1959) la possibilité de *doser*, par une méthode bactériologique appropriée, la quantité de phéromone produite par une reine car un antibiotique présent dans la reine semble en corrélation avec la phéromone).

Pour des groupes d'Abeilles plus importants (20, 60, 80, 200 à 300), l'attraction de la reine se manifeste déjà au bout de 24 heures, et les valeurs de t calculées sont significatives entre groupes d'1 à 2 Abeilles, comparés aux groupes de 20, et entre groupes de 20, comparés aux groupes de 60 à 80 Abeilles. Elles ne le sont plus entre groupes de 60 à 80 Abeilles, comparés aux groupes de 200 à 300, ce qui indique qu'à partir de 60 Abeilles l'effet du nombre ne se fait plus sentir : le pouvoir d'attraction des reines, au bout de 24 heures, est identique, qu'elles soient nourries par 300 ou par 60 Abeilles. Toutefois l'attraction est différente pour des périodes de temps inférieures à 24 heures.

Nous pouvons donc conclure que des groupes de plus en plus nombreux d'ouvrières accélèrent de plus en plus l'apparition de la phéromone; mais qu'il existe un nombre-limite d'Abeilles accompagnatrices, au-dessus duquel il n'y a plus d'effet accélérateur.

L'étude de l'apparition de la phéromone attractive dans des ruchettes normalement peuplées a retenu plus particulièrement notre attention : des reines étaient introduites, par groupe de 10 à 15, selon les éclosions, dans des ruchettes orphelines, peuplées d'environ 2 000 à 3 000 ouvrières. Chaque reine était enfermée dans une cagette de 4 × 3,5 × 2 cm, dont l'une des faces était obturée par une grille à reine. De cette façon, les ouvrières de la ruchette pouvaient pénétrer dans la cagette contenant la reine et la nourrir; mais les reines ne pouvaient sortir de leur prison (fig. 6).

En opérant ainsi, le pouvoir des reines peut apparaître au bout de la première

heure ; mais chez quelques reines du groupe seulement. Cela s'expliquerait par le fait que, lorsque les Abeilles ont plusieurs reines à nourrir, elles n'en alimentent que quelques-unes, et peu ou pas du tout les autres.

Nous avons alors introduit les reines, non plus par groupes, mais une par une

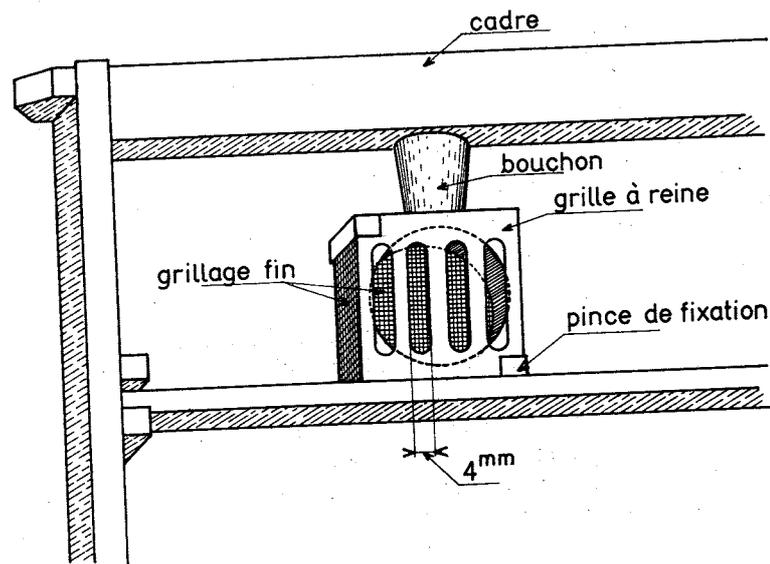


Fig. 6 — Cagette Zander modifiée pour l'étude de l'apparition de la phéromone attractive, chez les reines vierges (en présence d'ouvrières).

dans la nourricerie: l'attraction se manifeste déjà au bout d'une demi-heure (5,5 Abeilles attirées). Les résultats sont les suivants :

1 ♀ par ruche pendant 3 h.	nombre moyen d'Abeilles attirées	10	(10♀)
—	1 h.	—	6 (6♀)
—	½ h.	—	5,5 (6♀)
—	¼ h.	—	0,29 (10♀)

Ils confirment les premières expériences en nourricerie, à savoir que, lorsque les Abeilles ont plus d'une reine à nourrir, elles s'en occupent dans l'ensemble beaucoup moins bien que lorsqu'elles n'en ont qu'une à soigner. Les reines délaissées par les nourrices sont moins attractives que les autres.

Conclusion :

Le pouvoir d'attraction des reines vierges est en relation directe avec le nombre d'ouvrières qui les accompagnent : l'attraction se manifeste d'autant plus rapidement qu'elles sont entourées d'un plus grand nombre d'Abeilles nourrices.

Il est probable que, dans les conditions normales de remplacement d'une reine dans une colonie, la jeune reine naissante devient très vite attractive.

Nous tirerons aussi de cette étude la conclusion qu'il faut insister sur le rôle des ouvrières dans le nourrissement de la reine. Il est probable que les substances qu'elles

lui distribuent favorisent l'apparition de la phéromone. D'ailleurs nous avons relevé, dans un travail de BUTLER (1956), une communication orale de J. SIMPSON, dans laquelle cet auteur suggère que la diminution de la production de substance royale, qui se manifeste dans les phénomènes de supersédure, serait en rapport avec la réduction de la quantité de nourriture larvaire (gelée royale) que les ouvrières distribuent à la reine : les ouvrières, moins attirées par leur reine, puisqu'elle posséderait peu de substance, la nourriraient moins bien.

On s'est demandé si, dans ce cas, il s'agissait d'une diminution de la quantité de phéromone, répartie sur les téguments royaux, ou d'une baisse de l'activité sécrétrice des glandes mandibulaires.

D'autre part, du fait que des reines, qui n'ont jamais été au contact d'ouvrières, deviennent quand même attractives, au bout de plusieurs jours, on est conduit à admettre qu'elles peuvent produire au moins une certaine quantité de la phéromone ; mais celle-ci apparaît plus tardivement en l'absence d'ouvrières. La présence des ouvrières *accélérait*, mais *ne déterminerait pas* son apparition.

Il est possible que la formation de la phéromone dépende de l'alimentation donnée par les nourrices pendant le stade larvaire. Cette hypothèse pourrait expliquer en partie le pouvoir plus marqué de certaines reines par rapport à d'autres. La quantité de nourriture reçue par une larve de reine ou d'ouvrière est en effet très variable ; les larves royales bien nourries donneraient naissance à des reines imago contenant plus de phéromone.

Sur la nature des aliments que les reines adultes reçoivent des ouvrières, on ne peut encore rien affirmer. Peut-être s'agit-il de la même substance que les ouvrières distribuent déjà aux larves royales — ou alors se trouverait-on en présence d'un tout autre mécanisme : le nourrissage des reines par les ouvrières entraînant le déclenchement de la formation de phéromone par excitation nerveuse ou neuro-humorale ; l'apport d'éléments nutritifs par les ouvrières ne jouant aucun rôle direct dans sa formation ?

Il semble bien, connaissant la composition chimique de la phéromone I et ses rapports avec certains des acides de la gelée royale, que la première hypothèse soit la plus juste.

B. — Durée de contact.

Le pouvoir inhibiteur des reines sur l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières dépend de la durée de contact des ouvrières avec les reines. Les reines offertes aux ouvrières restent dans les cagettes pendant une période de temps bien déterminée. Cette période peut varier d'une à plusieurs heures par jour et peut s'étendre sur plusieurs jours.

Nous avons recherché s'il suffisait de présenter, pendant un temps très court, différents cadavres de reines pour obtenir encore un effet inhibiteur.

Dans tous les cas, les cadavres de reines ont été offerts *in toto* aux ouvrières, et les ont toujours attirées. Ils n'ont jamais été présentés plus d'une fois par jour ; mais l'expérience était répétée chaque jour. Nous n'avons jamais été au-delà du dixième jour de contact. La durée de nourrissage en pollen s'étalait sur une période de 15 jours. On a toujours contrôlé dans les cagettes qu'il y avait eu effectivement consommation de pollen.

Nous avons groupé les expériences en cinq séries, correspondant à des envois de reines en provenance d'un même rucher et soumises à l'expérience dès leur arrivée (tableau n° 5.)

Dans la série I, les reines ont été présentées pendant 7, 5, 3 et 1 heures, pendant 10 jours. Dans deux des cagettes, les ouvrières ont reçu, non pas 1, mais 3 reines mortes. Nous avons en effet supposé que, plus les reines mortes étaient nombreuses c'est-à-dire plus il y avait de phéromone à la disposition des ouvrières — plus l'inhibition devait être forte, même pour de petites durées d'exposition.

Nous ne pouvons tenir compte des résultats obtenus sur deux essais ; mais *il ne semble pas que l'inhibition ovarienne soit proportionnelle au nombre de reines mortes dans les cagettes* (reines VI et VII).

La reine I, présentée 7 heures par jour pendant 10 jours, n'inhibe pas le développement des œufs. Par contre, la reine VI, présentée 1 heure par jour pendant le même temps, est plus inhibitrice que la reine I, puisque le pourcentage d'Abeilles ovigères est plus faible. La reine III, présentée 5 heures par jour, pendant 10 jours, inhibe autant que la reine VI, dont nous venons de parler, présentée pendant 1 heure seulement.

La reine IV, présentée 3 heures par jour, pendant 10 jours, est par contre plus inhibitrice que la reine II, présentée 5 heures, pendant le même temps.

Les résultats sont identiques pour la série II : la reine VIII, présentée plus longtemps aux ouvrières que la reine X, est cependant moins inhibitrice que celle-ci.

Dans la série III, les pourcentages d'Abeilles ovigères sont tous au-dessus du pourcentage-limite, fixé à 33,3 p. 100. Les reines, présentées 16 heures par jour pendant 3 jours et 2 jours, n'inhibent pas plus que celles qui sont présentées 8 heures pendant le même temps. Leur pouvoir inhibiteur est très faible, puisque 60 à 66,6 p. 100 des Abeilles ont des œufs. *Il semble donc que des présentations de reines mortes, pendant plusieurs heures, mais seulement pendant 2 à 3 jours, ne suffisent pas à inhiber l'apparition des œufs dans les ovaires des jeunes Abeilles.* De même, les reines XVII, XVIII et XIX, exposées moins longtemps par jour sur des périodes de temps plus longues, n'ont pas inhibé non plus le développement des œufs. Il en est de même des reines VI (33,3 p. 100) et XI (66,6 p. 100). (Pourcentages égaux et supérieurs à la limite).

Nous pensons que les Abeilles prélèvent normalement la phéromone d'une façon continue et à petites doses sur le corps des reines. Lorsqu'il se produit un arrêt de consommation et que celui-ci est prolongé ou bien se renouvelle souvent, les ouvrières peuvent alors former des œufs. Cette constatation nous paraît d'ailleurs en rapport avec l'observation des reines attractives, en étuve, où l'on remarque la permanence du cortège d'ouvrières qui s'intéressent à elles et les lèchent. Il est évident que tout dépend aussi de la quantité de phéromone que possèdent les reines. Si elles sont fortement attractives, l'arrêt de la consommation journalière de phéromone pourra être plus long.

Si nous comparons, dans les deux dernières séries, des durées identiques d'exposition, les pourcentages ne sont pas les mêmes et varient dans la 4^e série, pour une exposition de 5 heures par jour (reines XX, XXI et XXII), de 29,41 p. 100 à 60 p. 100 ; et, dans la 5^e série (reines XXIII à XXVIII) de 26,6 p. 100 à 80 p. 100. La comparaison des 5 séries entre elles, pour des durées semblables, d'exposition donnent des chiffres qui sont dissemblables pour une exposition de 7 heures : nous obtenons de 26,6 p. 100 à 80 p. 100 d'abeilles ovigères ; pour 5 heures : de 29,41 p. 100 à 60 p. 100 ; pour 3 heures : de 6,6 p. 100 à 40 p. 100 ; pour 1 heure : de 33,3 p. 100 à 66,6 p. 100.

TABLEAU 5

N ^{os} des reines	Date des expériences	Nature des reines	Durée de présentation des reines	Nombre d'Abeilles engagées et leur âge au début expérience	% d'Abeilles ovigères en présence des reines	% d'Abeilles ovigères chez les témoins
I	7.7.55	Reine féconde noire.	7 heures pend. 10 jours	55 Abeilles de 1 j.	60	60
II	—	Reine féconde de même provenance (1).	5 — 10 —	—	46,6	—
III	—	—	5 — 10 —	—	33,3	—
IV	—	—	3 — 10 —	—	26,6	—
V (3)	—	3 reines de même provenance.	3 — 10 —	—	13,3	—
VI	—	—	4 — 10 —	—	33,3	—
VII (3)	—	3 reines de même provenance.	1 — 10 —	—	53,3	—
VIII	12.9.55	Reine féconde noire.	7 heures pend. 6 jours	50 Abeilles de 2 j.	66,6	66,6
IX	—	Reine féconde de même provenance (2).	5 — 6 —	—	46,6	—
X	—	—	3 — 6 —	—	6,6	—
XI	—	—	1 — 6 —	—	66,6	—
XII	4.10.55	Reine féconde noire.	48 heures consécutives.	30 Abeilles de 3 j.	80	53-60
XIII	—	Reine féconde de même provenance (3).	16 heures pend. 3 jours	—	66,6	—
XIV	—	—	8 — 2 —	—	60	—
XV	—	—	8 — 3 —	—	60	—
XVI	—	—	4 — 2 —	—	66,6	—
XVII	—	—	4 — 10 —	—	60	—
XVIII	—	—	3 — 10 —	—	40	—
XIX	—	—	1 — 10 —	—	53,3	—
XX	11.11.55	Reine féconde de même provenance (4).	5 heures pend. 6 jours	30 Abeilles de 3 j.	29,41	46,6
XXI	—	—	5 — 6 —	—	60	—
XXII	—	—	5 — 6 —	—	40	—
XXIII	13.7.56	Reine féconde cauc. 1 an.	7 heures pend. 10 jours	53 Abeilles de 1 j.	46,6	66,6
XXIV	—	Reine féconde cauc. 1 an.	7 — 10 —	—	26,6	—
XXV	—	Reine féconde noire.	7 — 10 —	—	73,3	—
XXVI	—	Reine féconde ital. 1 an	7 — 10 —	—	80	—
XXVII	—	—	7 — 10 —	—	60	—
XXVIII	—	—	7 — 10 —	—	60	—

Tous ces faits mettent en lumière des différences individuelles importantes quant à la qualité et à la quantité de phéromone attractive. Il en ressort que l'inhibition de la formation des œufs n'est pas du tout proportionnelle aux nombres d'heures de présentation des différentes reines dans les cagettes considérées ensemble. Elle n'est proportionnelle au temps de présentation que pour une reine considérée isolément, offerte plus ou moins longtemps dans différentes cagettes ; mais les courbes diffèrent beaucoup selon les reines. Les courbes suivantes (fig. 7) correspondent à l'examen de trois reines

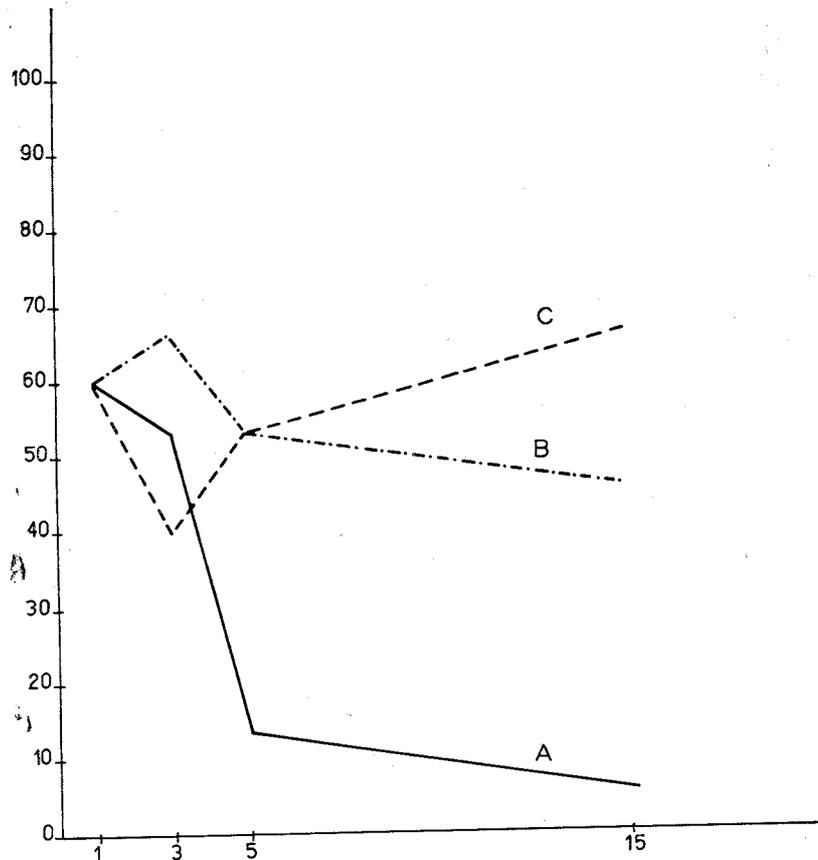


FIG. 7 — Inhibition de la formation des œufs dans les ovaires d'ouvrières en fonction de la durée de présentation d'une reine (en abscisse : nombre d'heures de présentation, en ordonnée : pourcentage d'Abeilles ovigères).

présentées 1, 3, 5 et 15 heures par jour, pendant 6 jours (reine A), et 5 jours (reines B et C) pour les périodes de temps allant de 1 à 5 heures ; et, pendant 5 jours (reine A) et 4 jours (reines B et C), pour la période de temps la plus longue, correspondant à 15 heures. Nous avons porté en abscisse le nombre d'heures de présentation au cours d'une journée et en ordonnée les pourcentages d'ovigères obtenus en fin d'expérience.

Pour les deux reines A et B, les pourcentages diminuent lorsque le temps de présentation des reines augmente, c'est-à-dire que l'inhibition exercée par la reine

est d'autant plus forte que la reine reste plus longtemps dans la cagette. Ce phénomène est plus net pour la reine A. Pour la reine C, on n'observe rien de semblable. Nous pensons que, lorsque les reines sont peu attractives, leur présence pendant des temps plus ou moins longs, dans les cagettes, n'a aucune action sur le développement des œufs. Les résultats ne sont nets que lorsque les reines mortes sont fortement attractives. Ces variations dans le pouvoir d'attraction des reines se traduisent par des pourcentages plus ou moins forts d'ovigères. Il est probable, si l'on tient compte des différents facteurs qui semblent entrer en jeu pour favoriser l'apparition de la phéromone chez les reines vivantes (nombre d'Abeilles en contact avec la reine, âge des reines, influence de leur captivité, alimentation), que celle-ci n'est pas émise d'une façon parfaitement régulière. Peut-être existe-t-il un cycle d'émission de cette substance ?

C. — Essai de mise en évidence d'un cycle annuel d'émission de la phéromone.

Nous avons essayé de déceler s'il n'existe pas chez les reines vivantes un cycle d'émission de la phéromone. La méthode en est simple : elle consiste à entourer le corps des reines vivantes de papier-filtre, pendant trois heures et demie. Les reines, entourées de leur papier tapissant un cylindre de verre, sont suspendues entre

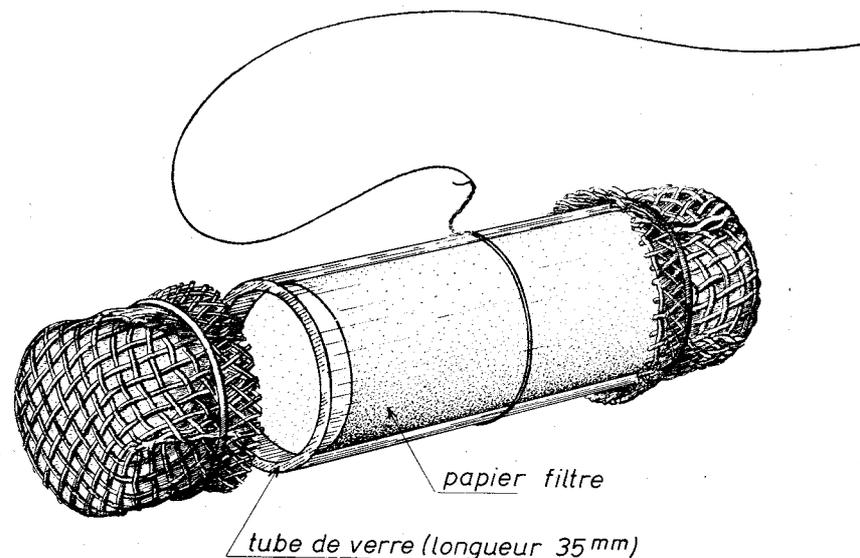


FIG. 8 — Tube de verre tapissé de papier-filtre, pour le dosage de la phéromone attractive léguminaire.

deux cadres à couvain et alimentées à travers une toile métallique par les ouvrières de la colonie (fig. 8).

Les papiers imbibés de « l'odeur de reine » sont ensuite présentés à des ouvrières encagées. On compte le nombre d'ouvrières attirées par ceux-ci. Les expériences sont répétées chaque mois.

Malheureusement, la plupart des reines que nous avons examinées n'ont pu être suivies pendant toute une année. La presque totalité des ruchettes qui les hébergeaient ont mal hiverné, et les reines sont mortes au cours ou à la fin de l'hiver. Cependant, ces résultats partiels nous ont permis d'entrevoir un phénomène ressemblant à un cycle. En effet, les reines que nous avons pu suivre, au cours des quelques mois d'hiver se sont révélées fortement attractives. La production de phéromone paraît plus faible d'avril à juin ; puis l'attraction redevient plus forte (fig. 9).

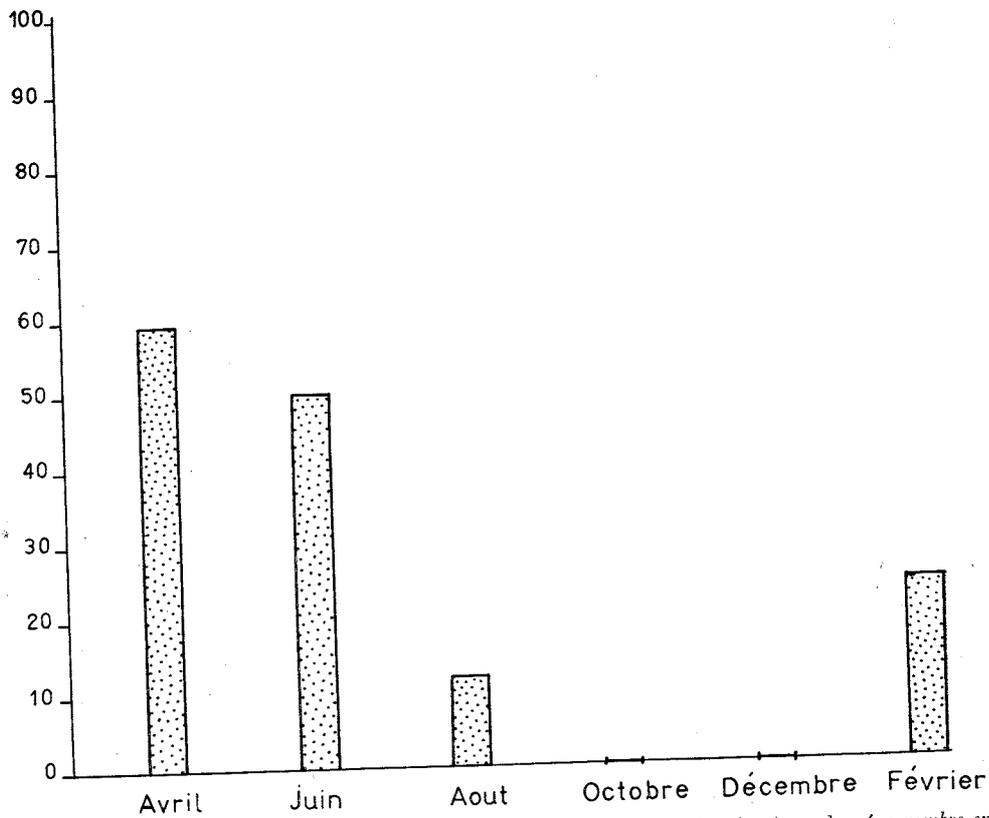


FIG. 9 — Mesure du pouvoir attractif de papier-filtres imbibés de l'odeur de reine (en ordonnée : nombre en % de réponses négatives d'Abeilles attirées auprès des papiers).

A la lumière de ces résultats, et en tenant compte de ceux d'ALLEN (1957) sur le nombre d'Abeilles constituant la « cour » des reines pendant les différents mois de l'année, nous avons formulé l'hypothèse suivante :

Les ouvrières, moins nombreuses dans la colonie en hivernage, et dans l'impossibilité de renouveler leurs réserves, tant pour se nourrir elles-mêmes que pour nourrir la reine, vivent au ralenti et s'occupent le moins possible de celle-ci. Il est probable — mais nous ne l'avons pas vérifié à ce moment-là — que l'activité sécrétrice des glandes mandibulaires des reines diminue beaucoup.

Selon ALLEN, pendant l'hiver, les reines sont très peu léchées ; elles doivent

alors conserver la phéromone sur leurs téguments. Cette solution d'épargne expliquerait le fort pouvoir d'attraction des papiers et le maintien de la « cour », noté par le même auteur.

A la reprise de l'activité des ouvrières, au printemps, et avec le démarrage de la ponte de la reine, qui quémante sans cesse une nourriture plus abondante, la sécrétion des glandes mandibulaires reprendrait ; mais la phéromone, répandue sur le corps des reines, serait avidement consommée par les ouvrières qui ne cessent de la lécher au cours de ses déplacements.

On arrive alors à la conclusion suivante : *c'est que des reines aux téguments peu attractifs peuvent avoir des glandes mandibulaires actives ou non.*

La méthode particulière que nous avons appliquée ici, ne nous révèle qu'un des aspects de la physiologie de la phéromone.

CHAPITRE VII

LES INTERACTIONS SOCIALES ET LA PHÉRORMONE

A. — Trophallaxie entre reines vivantes et ouvrières.

Bien avant la mise en évidence de l'existence de la phérormone, et pour vérifier l'une des hypothèses de HESS (1942) (Voir chapitre I, B) concernant la présence possible d'une *substance trophique*, inhibitrice du développement des œufs, distribuée par la reine à ses ouvrières, nous avons entrepris d'étudier la nature des échanges nutritifs entre reine vivante et ouvrières.

L'absence d'œufs dans les ovaires d'une population de 300 ouvrières, suralimentée en pollen, mais possédant une reine, nous parut être en faveur de l'hypothèse de HESS.

Pour la vérifier, nous avons réalisé les expériences suivantes :

Le diagramme (1) résume les expériences 1 à 4.

Soit un ensemble de 3 à 5 cagettes, accolées et séparées les unes des autres par une toile métallique simple à mailles de 1,5 mm : nous introduisons dans l'une d'elles (cagette centrale, exp. 1 — latérale, exp. 2 à 4) une reine (féconde ou vierge) : exp. 2 B) accompagnée de 10 Abeilles au maximum. Dans les cagettes voisines se trouvent des groupes d'ouvrières (30 : exp. 1 D — 100 : exp. 1 G, exp. 2, 3 — 50 : exp. 4) âgées de moins de 4 jours. Les ouvrières orphelines étaient nourries, en plus du candi et de l'eau, avec des gâteaux de pollen découpés dans une ruche (exp. 1, 2C, 3) ou du pollen en pelotes récolté à la trappe (exp. 2, A.B. ; exp. 4).

Dans presque tous les cas, *les dissections d'Abeilles de la cagette la plus proche de celle contenant la reine ne révèlent pas d'Abeilles ovigères* : (0 p. 100, exp. 1, 2, A.C., 4 ; sauf exp. 2 B : 12 p. 100, cas d'une reine vierge, et exp. 3 : 20 p. 100).

Les reines étaient dans l'impossibilité de pondre, car elles n'avaient aucune cellule à leur disposition.

Il fallait donc admettre que, lorsque la reine se trouve au milieu d'ouvrières (300) ou isolée de celles-ci (30, 50, 100) *par une seule toile métallique*, sa présence suffit à empêcher le développement des œufs dans les ovaires des ouvrières qui l'entourent ou qui se trouvent le plus près de sa cagette. Ces expériences sont comparables à celles de HAYDAK, où la reine se trouvait dans l'impossibilité de pondre. Alors ses Abeilles, bien qu'elles aient eu à leur disposition une nourriture abondante, ne purent se transformer en ouvrières pondeuses.

Des expériences semblables ont été refaites avec des cagettes doubles ; mais les reines étaient introduites au sein d'une petite population, composée de plus de 10 individus (de 50 à 100). Cette population était séparée, par une toile métallique de même dimension que précédemment, d'un groupe d'ouvrières du même âge.

G	C	D
100 ♂ 2-4 jours Pollen et candi 0 % d'ovigères.	(♀ f.) + 10 ♂ Candi	30 ♂ 1-4 jours Pollen et candi 0 % d'ovigères.

Exp. N° 1

100 ♂ — 2 jours Pollen et candi	100 ♂ — 2 jours Pollen et candi	(♀ f.)A.C. + 10 ♂ (♀ v.)B. Candi
24 % (♀ f.)A 44 % (♀ f.)C 60 % (♀ v.)B	0 % (♀ f.)A 0 % (♀ f.)C 12 % (♀ v.)B	

Exp. N° 2 A(♀ f.)-B(♀ v.)-C(♀ f.)

100 ♂ — 2 jours Pollen et candi 60 % d'ovigères.	100 ♂ — 2 jours Pollen et candi 68 % d'ovigères.	100 ♂ — 2 jours Pollen et candi 20 % d'ovigères.	(♀ f.) + 10 ♂ Candi
--	--	--	------------------------

Exp. N° 3

50 ♀ 2-3 jours Pollen et candi 40 % d'ovigères.	50 ♀ 2-3 jours Pollen et candi 44 % d'ovigères.	50 ♀ 2-3 jours Pollen et candi 48 % d'ovigères.	50 ♀ 2-3 jours Pollen et candi 0 % d'ovigères.	(♀ f.) + 10 ♂ Candi
---	---	---	--	------------------------

Exp. N° 4

Diagramme 1 : (♀ f.) = reine féconde
(♀ v.) = reine vierge
C. = cagette centrale (Exp. 1-2)
G. = cagette placée à gauche de C (Exp. 1-2 A.B.C.)
D. = cagette placée à droite de C (Exp. 1-2 A.B.C.)

Il était intéressant de vérifier si, dans ces conditions, c'est-à-dire lorsque la reine est entourée d'un nombre plus grand d'ouvrières, des contacts s'établissent encore avec les ouvrières de la population voisine. Le diagramme (2) résume les expériences 5 à 8.

Ici les cagettes sont pourvues d'une languette de cire gaufrée. Nous avons noté, sur le diagramme 2, l'étirage des cires par les ouvrières et le dépôt d'œufs par la reine dans les alvéoles. Les Abeilles ont reçu, dans tous les cas, du pollen en pelotes (frais : exp. 5 A et B ; et exp. 6 — conservé à 0°C : exp. 7 et 8).

Dans l'expérience 5 A, la reine a pondu dans les cellules étirées et les larves ont été prises en élevage, alors que celle de l'expérience B n'a pas pondu. Dans les deux cas, le pourcentage d'ovigères est très faible (13,3 p. 100), comparé à celui des témoins sans reine (60 p. 100, et 73,3 p. 100, cire non étirée).

Des auteurs comme TUNIN (1926), PERPELOVA (1928), GONTARSKI (1938) s'attachèrent à montrer l'importance du couvain, seul capable de provoquer l'inhi-

10 ♂ 1 — 3 jours Pollen et candi Cire non étirée 46,6 % d'Ab. ovigères.	(♀ f.) + 100 ♂ 1 — 3 jours Pollen et candi Cire étirée — ponte 13,3 % d'Ab. ovigères.
--	--

Exp. N° 5A

100 ♂ 1 — 3 jours Pollen et candi Cire étirée 46,6 % d'Ab. ovigères.	(♀ f.) + 100 ♂ 1 — 3 jours Pollen et candi Cire non étirée-pas de ponte 13,3 % d'Ab. ovigères.
---	---

Exp. N° 5B

20 ♂ 1 jour Pollen et candi Cire non étirée 0 % d'Ab. ovigères.	(♀ f.) + 50 ♂ 1 jour Pollen et candi Cire non étirée 0 % d'Ab. ovigères.
--	---

Exp. N° 6

100 ♂ 1 — 4 jours Pollen et candi Cire non étirée 6,6 % d'Ab. ovigères.	(♀ f.) + 50 ♂ 1 — 4 jours Pollen et Candi Cire non étirée 6,6 % d'Ab. ovigères.
--	--

Exp. N° 7

100 ♂ 1 — 3 jours Eau Cire non étirée Mortalité totale 2 jours après	(♀ f.) + 100 ♂ 1 — 3 jours Pollen et candi Cire étirée — ponte 6,6 % d'Ab. ovigères.
---	---

Exp. N° 8

Diagramme 2: (♀f.) = reine féconde

bition du développement des œufs dans les ovaires des ouvrières et la castration nutritive.

Dans ces expériences, *l'inhibition de la formation des œufs dans les ovaires est due à la seule présence de la reine*, le couvain ne paraissant pas jouer un rôle prépondérant.

*Les échanges entre reine et ouvrières de part et d'autre d'une toile métallique.
La notion de groupe indépendant.*

Dans les expériences 6 et 7, nous avons fait varier le nombre d'Abeilles accompagnant la reine, ainsi que celui du compartiment voisin, afin de pouvoir fixer d'une façon plus exacte le nombre minimum à partir duquel les échanges entre le groupe

pourvu d'une reine et les ouvrières voisines deviennent presque nuls. Ici des échanges ont eu lieu de part et d'autre de la toile métallique, puisque les ovaires des ouvrières du compartiment orphelin ne contiennent pas ou très peu d'œufs : 0 p. 100 (exp. 6) ; 6,6 p. 100 (exp. 7), alors que les témoins présentent 46,6 p. 100 d'ovigères dans chacune des deux cagettes.

Dans l'expérience 8, les ouvrières orphelines ne reçoivent que de l'eau et meurent très rapidement. L'expérience répétée avec une autre reine, entourée d'ouvrières adultes donna les mêmes résultats, ce qui prouve bien l'absence d'échanges entre les deux compartiments.

Comparons ces résultats avec deux expériences de VOOGD, (DE GROOT et VOOGD, 1954).

50 ♀ ♂ P.	50 ♀ ♀ 0 % ♂ P.	50 ♀ 0 % ♂ P.
--------------	-----------------------	------------------

Exp. I : ♂ P. = ouvrières pondueuses.

Trois cagettes, renfermant chacune 50 jeunes Abeilles, sont accolées les unes aux autres. La cagette du milieu contient une reine, séparée d'une des cagettes par une simple toile métallique, et, de l'autre, par deux toiles espacées de 20 mm. On note des ouvrières pondueuses seulement dans le compartiment séparé de la reine par un double grillage.

Une autre expérience de VOOGD prouve qu'il n'y a aucun contact entre les ouvrières, de chaque côté du grillage.

50 ♀ ♂ P.	♀ ♂	♂	50 ♀ ♂ P.
--------------	--------	---	--------------

Exp. II.

Ici le double grillage est remplacé par une plaque de zinc. La cagette médiane est divisée en deux parties, au moyen d'une grille à reine. La reine se trouve emprisonnée entre la plaque de zinc et cette grille. On note des ouvrières pondueuses dans le compartiment isolé de la reine par la plaque de zinc, ainsi que dans le compartiment isolé par une simple toile métallique. VOOGD conclut à la nécessité d'un contact direct entre chaque ouvrière et la reine, pour obtenir l'inhibition des ovaires des ouvrières. Elle ne précise pas quel genre de toile métallique elle a utilisé dans ses expériences.

En conséquence, lorsque la reine se trouve au milieu d'un groupe d'ouvrières supérieur à 50, il n'y a pas ou peu d'échanges trophiques avec les ouvrières du compartiment voisin ; et la reine n'empêche pas alors l'apparition d'un certain pourcentage d'ouvrières à gros ovaires. Lorsqu'elle n'est entourée que par un petit nombre d'ouvrières (égal ou inférieur à 50), ce nombre n'est pas suffisant pour assurer l'indépendance de cette petite population par rapport à la colonie voisine, et cette circonstance empêche

l'apparition d'ouvrières pondeuses, non seulement dans son compartiment, mais aussi dans le compartiment voisin. L'expérience de VOOGD (I) confirme les résultats des expériences 6 et 7.

Nous admettons que, dans les conditions des expériences, et avec les reines d'âge et d'origine inconnus qui nous ont été envoyées, *il faut un minimum de 100 Abeilles autour d'une reine pour qu'il ne s'établisse plus de contact avec les ouvrières du compartiment voisin.* Dans l'expérience de VOOGD (n° II), il ne s'est pas établi de contact avec les ouvrières isolées de la reine par une toile métallique, sans doute à cause de l'obstacle de la grille à reine, qui a maintenu le groupe d'ouvrières le plus près possible de sa reine.

Une jeune reine féconde et fortement inhibitrice peut empêcher le développement des œufs dans les ovaires de plus de 100 ouvrières accompagnatrices ; mais, même dans ce cas, les échanges avec la colonie voisine ne sont pas plus grands. Dès qu'elle est entourée par un groupe suffisant d'ouvrières, elle se déplace au sein de la petite colonie et ne s'occupe plus des ouvrières du compartiment le plus proche du sien.

Mais si le nombre d'ouvrières accompagnatrices est trop faible (inférieur à 50) et s'il ne peut se former une « cour » autour d'elle, il s'établit des rapports trophiques avec les ouvrières voisines.

Nous précisons qu'il s'agit ici d'échanges établis *entre la reine et les ouvrières* de l'autre côté de la toile.

Nous nous trouvons alors logiquement conduit à étudier les *échanges entre ouvrières.*

1° TROPHALLAXIE ENTRE OUVRIÈRES.

Suivant la technique précédente, nous introduisons dans deux cagettes, accolées et séparées l'une de l'autre par la même toile métallique à mailles de 1,5 mm (déjà utilisée dans les expériences comportant une reine), soit des groupes identiques (100, 50, 25, 2), soit des groupes inégaux (100/50-100/1-100/2-100/3-100/4-40/1) d'Abeilles de même âge ou d'âges différents.

Dans la première série d'essais, l'un des compartiments reçoit du candi et de l'eau, l'autre reçoit en plus une nourriture riche en pollen. On contrôle s'il y a eu échange de nourriture protéique entre les deux cagettes, en comparant les pourcentages d'Abeilles ovigères obtenus.

Dans une deuxième série d'essais, l'un des compartiments reçoit du candi et de l'eau. Dans l'autre, les Abeilles sont privées de toute nourriture, liquide et solide. On note s'il y a eu des contacts de part et d'autre de la toile, en comparant les mortalités.

Dans tous les cas, il n'y a jamais eu d'échanges trophiques à travers la toile.

Pourtant CHAUVIN (1952) a observé que lorsqu'une seule Abeille est isolée du restant de la population par une toile métallique à mailles de 1,5 mm, tout en recevant du sirop de sucre, elle quémande obstinément de la nourriture aux autres Abeilles. Mais si on lui adjoint quelques compagnes, il semble que les Abeilles se nourrissent entre elles plutôt que de part et d'autre de la cloison.

Nos expériences avec des Abeilles isolées, séparées d'un groupe d'abeilles ne peuvent être comparées à celle de CHAUVIN, qui sépare l'ouvrière dans une cagette de 2 × 2,5 × 3 cm, fermée par une toile métallique et introduit celle-ci dans le plateau perforé d'une ruchette (40 × 20 × 20 cm) contenant environ 2 500 ouvrières. Nous avons pensé que, dans notre cas, le nombre d'Abeilles était trop peu important

d'un côté (100 ouvrières au plus) pour que s'établissent des contacts de l'autre côté de la toile métallique avec des Abeilles isolées et privées de nourriture. Mais, d'après les expériences de LECOMTE, ce facteur ne jouerait aucun rôle (communication personnelle). Cet auteur a utilisé des cagettes divisées par une tôle perforée de trous de 4 mm de diamètre, peuplée seulement de 25 ouvrières, et montré qu'il y a bien échange de nourriture entre les deux groupes, à condition toutefois que l'un d'eux soit privé de nourriture. Tout dépendrait donc de la taille des perforations de la cloison. Si chacun des groupes reçoit de quoi se nourrir, les échanges sont interrompus. Cette observation confirme le travail de CHAUVIN, à savoir que, lorsque deux Abeilles peuvent se nourrir entre elles, les échanges avec l'extérieur sont réduits.

Influence de la taille des perforations dans la cloison de séparation.

Nous avons trouvé la raison de l'absence d'échanges dans nos cagettes : elle tient à la largeur de mailles des toiles.

Ce n'est qu'en 1958 que FREE et BUTLER étudièrent la taille des ouvertures à travers lesquelles les ouvrières peuvent en nourrir d'autres. Une centaine d'ouvrières sont placées dans de petites cages de $9 \times 6,5 \times 4,5$ cm, dont les deux grands côtés sont construits en toiles métalliques de différentes largeurs de mailles : 1/1 mm ; 1,5/1,5 mm ; 2,5/2,5 mm ; 2,5/5,5 mm. Les cages sont suspendues au centre du nid à couvain d'une colonie, pendant 48 heures, et le nombre des Abeilles mortes dans chaque cagette est ensuite évalué.

Les Abeilles, contenues dans les cagettes de 1/1 mm, 1,5/1,5 mm meurent de faim, parce qu'elles reçoivent peu ou pas du tout de nourriture des ouvrières de la colonie. *Pour qu'il y ait échange de nourriture, il faut que la largeur de la maille soit plus grande que la section transversale du proboscis de l'ouvrière.* Le nourrissage ne pourrait s'établir que s'il y a contact antennaire. Ces deux auteurs concluent que la largeur des mailles ne doit pas être inférieure à 2,5 mm.

Dans nos expériences, la largeur de mailles que nous avons utilisée se trouverait, d'après les résultats de FREE et BUTLER, ajoutés à ceux de LECOMTE, à la limite de la possibilité des échanges. Cependant, cette limite, fixée à 2,5 mm par ces auteurs, pour les échanges ouvrières-ouvrières, est en réalité plus faible *dans nos expériences où il s'agit d'échanges reine-ouvrières* : nous avons noté en effet une diminution du pourcentage d'Abeilles ovigères dans le compartiment séparé de la reine par des mailles de 1,5 mm. *L'attraction des ouvrières pour leur reine, ou le pouvoir d'attraction des reines pour les ouvrières est très grand, puisque des contacts peuvent encore s'établir avec des toiles à mailles inférieures à la limite fixée par FREE et BUTLER.* et bien qu'il y ait de la nourriture dans chacun des compartiments.

Mais les contacts sont nuls entre groupes d'ouvrières de même âge ou d'âges différents. L'attraction entre des ouvrières séparées par l'obstacle de la toile métallique est inexistante.

2° RÉSUMÉ ET CRITIQUE DES TRAVAUX DE MÜSSBICHLER.

Si nous évoquons ici les travaux de MÜSSBICHLER (1952), c'est parce que cet auteur a étudié l'influence des reines vivantes sur la construction des cellules royales et l'apparition des ouvrières pondeuses, lorsque les reines sont séparées des ouvrières

par des toiles métalliques, simples ou doubles, de différentes largeurs de mailles (1,5 mm ou 4 mm), et disposées de diverses manières. Nous sommes mieux préparés maintenant à interpréter ses résultats.

Quatre figures résument l'ensemble de son travail.

Première expérience (figure 10).

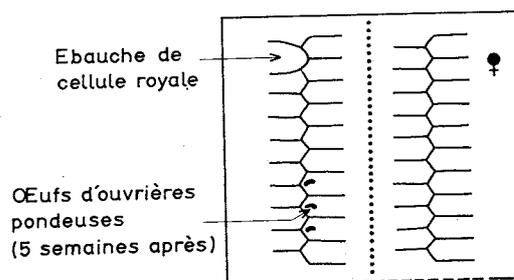


FIG. 10 — Ruchette ouverte à 2 cadres, séparée par un grillage métallique (1,5 mm, 4 mm de mailles) en une moitié avec reine et une moitié sans reine. Apparition 1 jour après, d'une ébauche de cellule royale, et, 35 jours après, d'ouvrières pondeuses dans la moitié orpheline.

Discussion 1 :

MÜSSBICHLER ne précise pas un facteur d'après nous essentiel : le nombre des Abeilles réparties dans chacun des deux compartiments comme nous l'avons vu. Lorsque la reine est accompagnée d'un petit nombre d'ouvrières (10 Abeilles), les ouvrières du compartiment voisin ne se transforment pas en ouvrières pondeuses, car la population avec reine échange alors de la nourriture avec sa voisine.

Lorsque le nombre d'ouvrières accompagnant la reine est plus grand (supérieur à 100 Abeilles) — et c'est probablement le cas ici — les deux moitiés de la ruchette fonctionnent comme deux colonies distinctes. Il n'y a plus d'échange de nourriture entre les deux et il apparaît des cellules royales et des ouvrières pondeuses dans la moitié orpheline.

Cependant l'auteur précise qu'il a constaté l'établissement d'un nourrissage réciproque à travers les toiles. Cette assertion nous paraît erronée si l'on en croit l'expérience de BUTLER (1954).

2 500 ♂ +	2 500 ♂ + ♀ +
Œufs - larves	Œufs - larves
B	A

Expérience de Butler : colonie divisée en deux par une toile métallique (3 mm de mailles) en une moitié avec reine A et une moitié sans reine B.

- 1° en A : beaucoup de nourriture — pas de cellule royale.
en B : beaucoup de nourriture — cellules royales.
- 2° en A : beaucoup de nourriture — pas de cellule royale.
en B : peu de nourriture — pas de cellule royale.

BUTLER conclut que les Abeilles non orphelines peuvent informer des Abeilles orphelines de la présence de leur reine, en leur distribuant une certaine quantité de phéromone I, qu'elles prélèvent sur le corps de la reine.

Dans l'expérience I de MÜSSBICHLER, nous supposons que chacun des deux compartiments contient à peu près la même quantité de nourriture, puisque les Abeilles peuvent butiner de part et d'autre de la toile métallique, exactement comme dans le cas de l'expérience I de BUTLER. L'ECOMTE (communication personnelle) retrouve les mêmes résultats.

Il est donc peu probable qu'avec une toile de 4 mm de mailles et une nourriture abondante, il y ait eu des échanges trophallaxiques. C'est pourquoi MÜSSBICHLER obtient des cellules royales.

Deuxième expérience :

Dans la même ruchette, le grillage métallique est remplacé par une grille à reine. Les ouvrières, sauf la reine, peuvent se déplacer de part et d'autre de la grille. Les Abeilles, séparées de leur reine par ce procédé, ne se sentent pas orphelines et ne construisent pas de cellule royale.

Discussion 2 :

Cela n'est pas un fait exceptionnel en apiculture. Lorsque la reine est isolée dans un espace restreint, les ouvrières ne construisent pas de cellule royale. Mais si l'espace est important et si la reine est très éloignée de son couvain, les ouvrières se sentent orphelines et en construisent.

Troisième expérience (figure II).

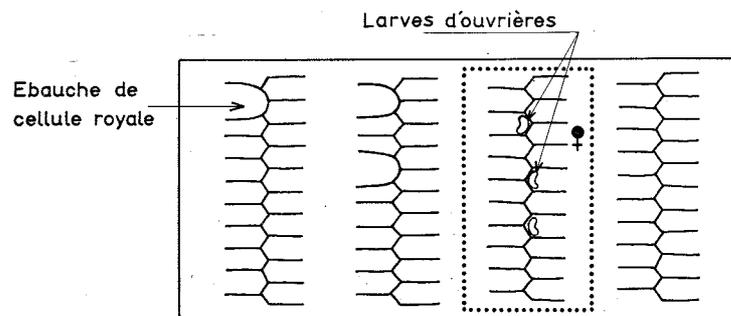


FIG. II — Ruche, dont un des cadres, avec Abeilles, reine et couvain « ouvert » est en grillagé (1,5 mm de mailles). Apparition un jour après, de plusieurs cellules royales.

Discussion 3 :

La « sensation » d'orphelinage des Abeilles extérieures au cadre est due à l'absence d'échange avec les Abeilles possédant la reine, parce que celle-ci est accompagnée d'un nombre suffisant de nourrices et que, d'autre part, la toile métallique est à mailles fines.

Quatrième expérience (figure 12).

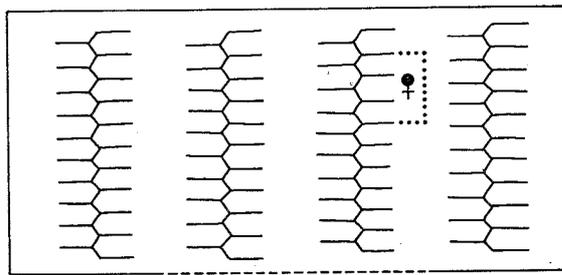


FIG. 12. — Ruche à 4 cadres, où la reine est emprisonnée sur l'un des rayons, dans une cage grillagée (1,5 mm ou 4 mm de mailles).
Pas de construction d'ébauche royale.
Apparition d'ouvrières pondueuses lorsque le couvain a été operculé.

Selon l'auteur, seule l'absence de couvain jeune est prépondérante pour la formation d'ouvrières à gros ovaires.

Discussion 4 :

La reine n'est pas accompagnée ; d'où échange de nourriture et absence de construction de cellule royale. Cependant BUTLER (1954) signale l'existence de telles cellules dans des colonies très fortes, dont la reine est claustrée. Lorsque les colonies sont faibles, le nombre de cellules diminue. C'est sans doute pourquoi il ne s'en forme pas dans l'expérience de MÜSSBICHLER. VUILLAUME (1958) a montré qu'une reine encagée n'empêche pas les ouvrières d'une ruche à dix cadres d'accepter des cellules royales « greffées ».

D'autre part, l'apparition d'ouvrières pondueuses n'est pas en contradiction avec nos expériences, parce que sa colonie était en état d'essaimage. On sait que dans de telles colonies, et malgré la présence d'une reine, apparaissent toujours des ouvrières pondueuses.

Cinquième expérience : (figure 13).

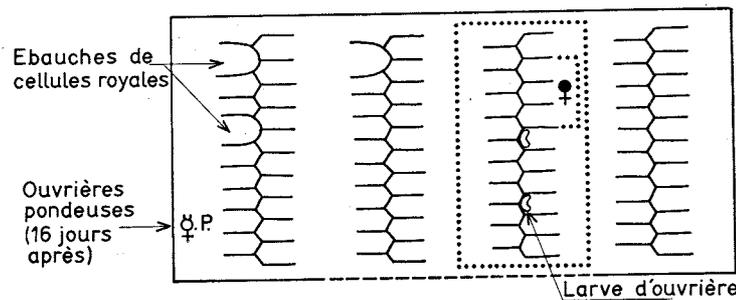


FIG. 13. — Reine enfermée dans une cage grillagée (4 mm de mailles), posée sur un cadre, avec couvain et ouvrières, lequel est entouré d'une toile métallique de même largeur de mailles.
Apparition 48 heures après, de cellules royales, et 16 jours après d'ouvrières pondueuses dans la population orpheline.

Discussion 5 :

L'échange de nourriture entre la reine engrillagée et les nourrices du cadre sur lequel elle est posée est actif, puisque la reine est seule et que la largeur des mailles est de 4 mm. Les échanges entre la colonie intérieure et la colonie extérieure sont restreints, parce que le nombre d'ouvrières des deux colonies est important et que les deux populations sont certainement bien nourries.

Conclusion générale :

Selon MÜSSBICHLER, la présence de la reine n'a aucune influence sur la formation des ouvrières pondueuses. L'absence de couvain « ouvert » serait seule responsable de l'apparition des ouvrières pondueuses. En cela, cet auteur rejoint l'opinion de PEREPELOVA (1928).

Nos résultats, comparés à ceux de MÜSSBICHLER, nous ont permis de saisir certains aspects de ce problème. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'apparition des ouvrières pondueuses, tandis que MÜSSBICHLER insiste davantage sur la formation de cellules royales. Ces deux processus se complètent, en se succédant : l'apparition d'ébauches royales est plus précoce que l'apparition d'ouvrières pondueuses. En effet, le premier phénomène survient environ 12 heures après l'absence de la reine ; le deuxième un peu plus tard, au minimum une semaine après l'orphelinage de la colonie.

D'autre part, nos expériences exigent un nombre d'Abeilles différent, plus élevé lorsqu'il s'agit pour les ouvrières d'entreprendre un élevage royal que pour se transformer en ouvrières à gros ovaires. L'étude des ouvrières pondueuses peut se faire en simple cagette d'observation, avec un nombre restreint d'Abeilles ; l'étude de la formation d'ébauches royales exige du couvain et un nombre plus important d'ouvrières. Celles-ci ne sont certainement pas dans le même état physiologique. Cependant, nous pensons que ces deux processus ne sont pas si éloignés l'un de l'autre. Comme nous l'avons indiqué au cours de la discussion, on peut trouver des cellules royales et des ouvrières pondueuses en présence d'une reine ; mais cela n'arrive que dans certains cas bien particuliers : dans des colonies en cours d'essaimage, par exemple, ou encore en cours de supersédure. On peut faire accepter des cellules royales en dehors de l'essaimage, par une colonie ; mais il faut alors que l'élevage en ait été entrepris dans une première colonie orpheline (VUILLAUME, 1958). DÖNHOFf nota, (1857) que des colonies d'ouvrières pondueuses essaient de produire des cellules royales.

Mais normalement, dans une ruche non essaimante, ou qui ne cherche pas à remplacer sa reine, il n'y a pas de cellule royale et pas, ou très peu, d'ouvrières pondueuses.

En ce qui concerne la nature des échanges que nous venons de décrire, nous pensons qu'ils sont en partie d'ordre alimentaire.

Lorsque les ouvrières nourrissent de jeunes larves d'ouvrières ou de reines, elles ne peuvent se transformer en ouvrières pondueuses, par suite de l'épuisement de leurs réserves. Cette hypothèse est la seule capable, à notre avis, d'expliquer le faible pourcentage d'ouvrières pondueuses pendant un élevage de reines ou d'ouvrières, et l'augmentation de celui-ci après l'operculation des cellules.

Cependant, au rôle du couvain, qu'on ne peut nier, s'ajoute aussi celui de la reine. Lorsque les ouvrières ont à nourrir une reine, féconde ou vierge, elles ne peuvent

garder pour elles-mêmes leurs réserves nutritives et, ainsi, ne peuvent se transformer en ouvrières à gros ovaires.

Nous concluons en disant que, quelle que soit la raison pour laquelle les ouvrières doivent dépenser leurs réserves : présence de couvain ou présence de reine, cette dépense a pour effet l'atrophie de leurs ovaires. Toute cause réduisant cette dépense : fin d'un élevage royal, absence de couvain et de reine, tend inversement à provoquer l'accroissement ovarien et la formation d'œufs dans les ovarioles.

Il faut ajouter, à la lueur des derniers résultats concernant la localisation de la phéromone, qu'au cours du nourrissage des reines par les ouvrières, celles-ci reçoivent de ces premières des sécrétions particulières, dont les effets renforcent le processus de la castration nutritive.

B. — Comparaison entre reines vivantes et reines mortes du point de vue de l'inhibition ovarienne des ouvrières.

Nous avons évalué l'inhibition de l'apparition des œufs chez des jeunes ouvrières encagées en présence d'une reine vivante, et comparé les pourcentages d'Abeilles ovigères avec ceux de nouvelles ouvrières mises au contact du cadavre de la même reine.

Dans cette expérience, nous avons voulu séparer les phénomènes de léchage pur, qui s'établissent autour d'un cadavre attractif de reine, des échanges supplémentaires d'ordre nutritif entre ouvrières et reine vivante.

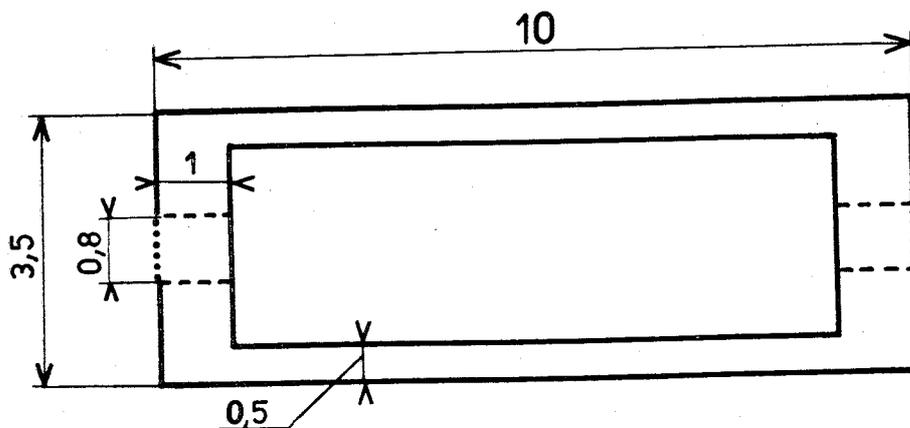


FIG. 14. — Intérieur d'une cage à reine, grandeur naturelle.

Toutes les reines examinées étaient des reines fécondes, d'origine et de provenance diverses.

Nous avons expérimenté en deux temps :

1° — Les reines étaient d'abord claustrées vivantes dans des « cages à reine » de bois. Ces cages avaient été choisies pour leurs dimensions relativement grandes : les reines, qui devaient y vivre pendant 15 jours, pouvaient aisément se déplacer et se retourner à l'intérieur de celles-ci.

Nous avons représenté figure 14 l'intérieur de la cage.

Les dimensions extérieures sont les suivantes : 10 cm de long sur 3,5 cm de large et 2 cm d'épaisseur ; les dimensions intérieures : 8 cm de long sur 2,7 cm de large et 1,3 cm d'épaisseur. A chaque extrémité de l'excavation obturée par une toile métallique à mailles de 2,5 mm, sont ménagés deux couloirs d'environ 1 cm de longueur sur 0,8 cm de largeur. Ces « cages à reine » servent, comme leur nom l'indique, à l'introduction de nouvelles reines dans des colonies orphelines. Dans ce cas, les deux orifices de sortie de la cage ne sont pas fermés par une toile métallique, mais sont garnis de sucre candi. La reine est libérée après consommation du candi par les ouvrières de la colonie et par les ouvrières qui l'accompagnent.

Dans cette expérience particulière, la reine était introduite sans accompagnatrice et sans aucune nourriture. La cage était recouverte d'une plaque de tôle perforée de deux sortes d'orifices : les uns, de 2 cm de diamètre, calculés pour permettre seulement aux ouvrières de nourrir leur reine, sans toutefois qu'elles puissent

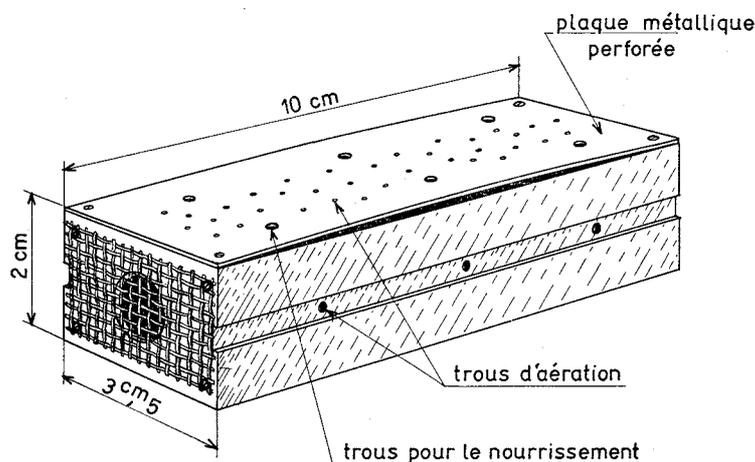


FIG. 15. — Extérieur d'une cage à reine (dispositif pour l'étude des échanges trophiques).

atteindre d'autres parties de son corps que les pièces buccales ; les autres, beaucoup plus petits et plus nombreux, servaient seulement à l'aération. Des orifices étaient également percés le long des parois latérales de bois. La plaque de tôle n'était pas parfaitement horizontale : nous lui avons donné une forme légèrement bombée pour que les ouvrières puissent venir aussi alimenter la reine sous la voûte médiane.

Nous avons représenté par la figure 15 la disposition du couvercle en tôle perforée, ainsi que la disposition des différents orifices latéraux.

La reine enfermée dans cette cage était alors introduite dans la grande cage expérimentale que nous avons déjà décrite (chapitre II), avec 60 à 70 ouvrières, âgées d'un jour. Elles recevaient la nourriture habituelle : eau, candi et pollen séparés.

Pour amorcer les contacts entre les ouvrières et leur reine, le sucre candi était placé, pendant les premières vingt-quatre heures, sur le couvercle en tôle perforée de la cage à reine. De cette façon, les jeunes ouvrières, attirées d'abord par la nourriture sucrée, venaient se grouper sur la boulette de candi et s'apercevaient ainsi rapidement de la présence d'une reine à l'intérieur de la cage. Lorsque l'on s'était

assuré que des rapports trophallaxiques s'étaient établis entre les ouvrières et la reine — et pour éviter aussi que cette dernière puisse atteindre le sucre candi — la nourriture était enlevée de la cage à reine et disposée sur le plancher de la grande cage.

Ces reines vivaient ainsi pendant toute la durée de l'expérience. A chaque série de reines examinées correspondait une cagette-témoin, contenant un nombre identique d'ouvrières, du même âge, qui recevaient exactement la même nourriture, mais restaient orphelines pendant les 15 jours d'expérience.

Au bout de ce temps, les ouvrières étaient endormies, tuées et disséquées. Nous

TABLEAU 6

Mesures du pouvoir inhibiteur des Reines vivantes et des mêmes reines mortes

Reines vivantes Nos	Pourcentages d'Abeilles ovigères chez les ouvrières				Reines mortes	Pourcentages d'Abeilles ovigères chez les ouvrières			
	%	%	%	%		%	%	%	%
1.	73,3	st. 3 46,6	st. 4 26,6	st. 5	même reine (1.)	66,6	46,6	20	
2.	46,6	46,6			— (2.)	53,5	40	13,3	
3.	26,6	26,6			— (3.)	60	40	13,3	6,6
4.	40	33,3	6,6		— (4.)	46,6	40		6,6
témoin pollen ..	100	13,3	6,6	80	témoin pollen	86,6	13,3	40	33,3
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	6,6	6,6		
5.	33,3	33,3			même reine (5.)	53,5	53,3		
témoin pollen ..	80	26,6	6,6	46,6	témoin pollen	80	40	20	20
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	13,3	13,3		
6.	0	0			même reine (6.)	26,6	13,3		13,3
témoin pollen ..	60	13,3	26,6	20	témoin pollen	100	20	13,3	66,6
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	0	0		
7.	46,6	6,6	40		même reine (7.)	66,6	20	33,3	13,3
8.	86,6	53,3	33,3		— (8.)	80	40	6,6	33,3
9.	93,3	53,3	40		— (9.)	73,3	40	33,3	
témoin pollen ..	100	20	26,6	53,3	témoin pollen	100		46,6	53,3
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	0	0		
10.	40	20	13,3	6,6	même reine (10.)	93,3	40	46,6	6,6
témoin pollen ..	60	26,6	13,3	20	témoin pollen	100	20	46,6	33,3
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	0	0		
11.	46,6	46,6			même reine (11.)	66,6	40	13,3	13,3
12.	40	40			— (12.)	53,3	46,6	6,6	
13.	73,3	60	13,3		— (13.)	66,6	60	6,6	
14.	60	53,5	6,6		— (14.)	73,3	73,3		
témoin pollen ..	86,6	6,6	53,3	26,6	témoin pollen	73,3	33,3	33,3	6,6
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	0	0		
15.	13,3	6,6		6,6	même reine (15.)	20	20		
16.	0	0			— (16.)	13,3	13,3		
17.	13,3	13,3			— (17.)	6,6	6,6		
18.	6,6	6,6			— (18.)	13,3	13,3		
témoin pollen ...	80	33,3	46,6		témoin pollen	53,3	46,6	6,6	
témoin sucre ...	0	0			témoin sucre	0	0		

avons évalué les résultats en pourcentage d'Abeilles ovigères (voir chapitre II : Matériel et méthode...). La reine était tuée aussi, mais par le froid à 0° et conservée quelques jours au réfrigérateur, avant d'être offerte à de nouvelles jeunes Abeilles.

2° — Les reines mortes étaient presque aussitôt remises en expérience. Leur cadavre était introduit dans une cagette contenant le même nombre d'Abeilles naissantes que dans l'expérience antérieure. Elles recevaient aussi le même pollen. Le couvain provenait de la même ruche. Les ouvrières avaient libre accès à toutes les parties du corps de la reine morte et pouvaient la lécher facilement.

Dans ce deuxième cas, les activités trophiques étaient évidemment complètement supprimées au profit des activités de léchage. L'expérience durait le même temps (15 jours) au bout duquel on procédait à la dissection. Les pourcentages d'Abeilles ovigères obtenus au cours de ce deuxième temps d'expérience, en présence des reines mortes, étaient comparés aux pourcentages obtenus, dans le premier temps, en présence des reines vivantes.

Nous avons groupé ces résultats par lots de reines examinées au cours d'une expérience complète : l'examen de l'effet inhibiteur de la reine maintenue vivante et l'étude de la même reine morte durait en tout un mois. Les expériences ont été entreprises de juin à septembre (tableau 6).

Nous avons noté, dans la deuxième colonne du tableau, l'état des ovaires des ouvrières qui ont nourri la reine vivante, et, dans la cinquième, l'état des ovaires de nouvelles Abeilles, qui ont léché le cadavre de la même reine. Les colonnes 3 et 6 donnent le détail des pourcentages d'Abeilles ovigères correspondant aux stades 3, 4 et 5, considérés comme bien développés et contenant des œufs.

1° INHIBITION DE LA FORMATION DES ŒUFS CHEZ LES OUVRIÈRES EN PRÉSENCE DES REINES VIVANTES.

Si nous examinons les chiffres concernant uniquement l'inhibition des œufs des ouvrières maintenues en présence d'une reine vivante, nous ne trouvons que 6 pourcentages d'Abeilles ovigères (reines 3, 6, 15, 16, 17, 18) en dessous de la limite de 33,3 p. 100, c'est-à-dire six résultats qui indiquent une inhibition très nette de la part des reines.

Dans l'ensemble, peu de reines ont exercé une influence inhibitrice : sur 18 reines testées, que nous avons pu maintenir en vie pendant 15 jours, les 2/3 n'ont pas inhibé le développement des œufs chez les ouvrières (les pourcentages vont de 40 à 93,3 p. 100).

Il est vraisemblable que le confinement de la reine dans un espace restreint, aux orifices très étroits, limite beaucoup les échanges entre les ouvrières et leur reine. Cette restriction des échanges aboutit à une restriction générale de la phéromone. Le métabolisme de la reine mal nourrie s'affaiblit et ses sécrétions mandibulaires se ralentissent.

Ce fait est en rapport avec ce que les apiculteurs ont observé : à savoir que des reines qui ont voyagé depuis longtemps sont acceptées difficilement par les ouvrières de la colonie réceptrice, probablement en raison de leur faible pouvoir d'attraction et d'inhibition.

On peut admettre que c'est ce qui se produit dans les expériences qui viennent d'être exposées.

Ainsi donc, la castration nutriciale étant presque inexistante, et le pouvoir inhibiteur de la phéromone très faible, il s'ensuit un développement des œufs dans les ovaires des ouvrières.

2° INHIBITION DE LA FORMATION DES ŒUFS
CHEZ LES OUVRIÈRES EN PRÉSENCE DES REINES MORTES.

D'autre part, si nous considérons les chiffres obtenus, concernant l'*inhibition des œufs dans les ovaires des nouvelles ouvrières maintenues en présence du cadavre de la même reine*, nous trouvons cinq résultats, au-dessous de la limite fixée à 33,3 p. 100 d'ovigères, qui correspondent aux reines n° 6, 15, 16, 17 et 18. Ces reines étaient fortement inhibitrices lorsqu'elles étaient vivantes et leurs cadavres restent encore très inhibiteurs. Mais la reine n° 3, inhibitrice au cours du premier temps de l'expérience, n'empêche plus le développement des œufs, lorsqu'elle est présentée morte à de nouvelles Abeilles : 60 p. 100 d'Abeilles ont des ovaires contenant des œufs.

Ces résultats peuvent s'expliquer facilement en observant que les cadavres de reines, qui ont inhibé l'apparition des œufs chez les ouvrières encagées, correspondent aux reines les plus inhibitrices de leur vivant (pourcentage inférieur à 13 p. 100).

Remarque :

En ce qui concerne précisément l'expérience en présence de la reine n° 3, le pourcentage d'Abeilles ovigères est légèrement plus fort : 26,6 p. 100 et voisin du pourcentage limite, fixé à 33,3 p. 100. On enregistre un pourcentage égal à 60 p. 100, lorsqu'elle est présentée morte dans la cagette d'observation.

L'inhibition des ovaires en présence des reines mortes ne s'observe que lorsque les reines sont déjà très attractives et inhibitrices de leur vivant, ce qui est une bonne preuve de l'importance de la phéromone. Nous pouvons donc à priori affirmer que les reines mortes sont moins inhibitrices que les reines vivantes.

3° ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS.

Nous avons évalué la différence x entre les deux pourcentages obtenus pour une reine, selon qu'elle est présentée vivante ou morte aux ouvrières. Si n expériences analogues ont été exécutées, la moyenne des x pour ces n expériences sera :

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Cette moyenne x sera positive si les reines mortes sont moins inhibitrices que les reines vivantes, c'est-à-dire si les pourcentages d'Abeilles ovigères sont plus forts. Pour savoir si elle peut être considérée comme significativement différente du hasard, on estime l'erreur type sur x à l'aide de la formule :

$$\sigma x = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

et l'on forme le rapport :

$$t = \frac{\bar{x}}{\sigma x}$$

La distribution du t est donnée par des tables en fonction du nombre n d'expériences et de différentes probabilités. En appliquant cette méthode, nous avons calculé les valeurs suivantes pour \bar{x} moy = + 10,68 et en l'appliquant dans la formule, nous avons :

$$\sigma x = \sqrt{\frac{4875,99}{18(18-1)}} = 15,9$$

ou

$$t = \frac{10,66}{4} \neq 2,7.$$

La lecture des tables indique, pour $n = 18$, et une probabilité P de 0,05, un t égal à 2,1. Les résultats expérimentaux indiquent un t supérieur et égal à 2,7. La valeur de t est donc significative et nous permet de conclure que les cadavres des reines, d'une façon générale, exercent une influence inhibitrice moins forte sur la fécondité des ouvrières que les reines vivantes.

Nous avons appliqué cette méthode à l'analyse des pourcentages obtenus chez des ouvrières qui ont été au contact de reines vivantes ou mortes, et comparés ceux-ci aux pourcentages enregistrés chez des Abeilles orphelines témoins. On a évalué de la même façon la différence x entre ces différents pourcentages. On obtient, dans le cas des pourcentages d'Abeilles ovigères, en présence d'une reine vivante, comparés à ceux des ouvrières témoins, une valeur de t égale à 8,3 et, dans le cas des pourcentages d'Abeilles ovigères en présence de la reine morte et ceux des témoins une valeur de t égale à 6,6.

La valeur de t , correspondant à la comparaison entre ouvrières accompagnées d'une reine morte et ouvrières témoins, est plus faible que celle qui correspond à la comparaison entre ouvrières accompagnées d'une reine vivante et témoins sans reine. Cela nous permet d'affirmer que les reines mortes exercent quand même une légère inhibition sur leurs ouvrières, quand on compare les résultats aux témoins ; mais cette inhibition est beaucoup plus faible que l'inhibition exercée par les reines vivantes.

Conclusion :

De tous ces faits nous concluons que des reines vivantes, enfermées dans un espace restreint, sont moins inhibitrices vis-à-vis de leurs ouvrières que des reines non emprisonnées. Ce moindre pouvoir d'inhibition est en relation directe avec une production moins grande de phéromone, liée à la restriction des échanges entre reine et ouvrières.

Le développement de la phéromone paraît bien être activé par les échanges nutritifs qui s'établissent entre les ouvrières et leur reine. Cette faible inhibition de la part des reines claustrées est encore plus faible chez les cadavres des mêmes reines ; mais elle se manifeste néanmoins.

CHAPITRE VIII

RECHERCHES PARALLÈLES EFFECTUÉES CHEZ LES TERMITES, LES FOURMIS ET LES HALICTES

L'idée que la reine, chez les Insectes sociaux, pouvait sécréter une substance inhibitrice de la formation d'autres reproducteurs, n'était pas entièrement nouvelle : elle se trouvait déjà en gestation dans les travaux d'auteurs plus anciens, surtout chez ceux qui s'occupèrent des Termites.

PICKENS (1932) avait émis l'hypothèse que la reine des Termites s'opposait passivement à l'apparition de reines supplémentaires par des sécrétions de son corps (socio-hormones — ecto-hormones), qui, léchées par les larves et les nymphes, et échangées entre elles, arrêtaient le développement de leurs organes génitaux.

Cette idée fut reprise par CASTLE (1934), qui essaya d'obtenir l'inhibition ovarienne des larves et des nymphes de *Zootermopsis*, séparées du couple royal, en mélangeant à leur nourriture des extraits éthérés ou alcooliques de sexués néoténiques. Il obtint d'ailleurs, dans certains cas, un retard de la ponte.

GRASSÉ avec LE MASNE (1938), chez *Calotermes flavicollis* signale que, lorsque deux colonies, l'une normale avec roi et reine, l'autre orpheline, ne sont séparées entre elles que par une toile métallique fine, cette dernière acquiert des sexués néoténiques, dans les délais normaux ; mais les détruit au fur et à mesure de leur différenciation. Il pense que cette destruction est en rapport avec les contacts existant entre les deux colonies ; mais que, si le rôle des antennes semble ici très important (stimuli sensoriels), il ne faut pas rejeter pour cela l'hypothèse des socio-hormones.

EMERSON (1939) présenta à des colonies, sur du papier-filtre, des extraits (dans les mêmes solvants que CASTLE) des différentes castes de Termites et enregistra un certain retard sur la durée de développement des castes.

LIGHT (1944) amplifia ces expériences chez *Zootermopsis* en donnant en nourrissement à une colonie orpheline des extraits de reines fonctionnelles. Il n'obtint jamais la suppression totale de la formation des sexués de remplacement. Il déclara que la preuve d'une inhibition ovarienne, provoquée par des socio-hormones, sécrétées par les sexués fonctionnels et distribuées à tous les membres de la société n'a pas encore été donnée.

Chez les Termites.

Chez les Termites, la reine attire intensément les ouvriers qui se tiennent à son voisinage immédiat, à tel point qu'il s'ensuit de très grandes modifications de leur comportement. On peut compter souvent plus de cent ouvriers serrés autour

d'elle. Parmi eux, certains la lèchent avec avidité. Il suffit d'enlever la reine d'une de ces colonies pour qu'aussitôt les gonades d'un certain nombre de larves et de nymphes soient stimulées et qu'apparaissent des reines supplémentaires.

Mais, chez les Termites, les choses se compliquent du fait de l'existence d'un couple royal, qui reste en permanence dans la colonie.

LUSCHER (1952-1955-1956) montra que, pour qu'il y ait suppression totale des sexués de remplacement, mâles et femelles, les deux sexués doivent être présents ensemble. Il faut aussi qu'il puisse y avoir contact intime avec eux, pour que l'action inhibitrice soit garantie. Par contre, si la reine existe seule, elle donnera naissance à plus de sexués de remplacement mâles, c'est-à-dire qu'elle exercera une action inhibitrice sur la formation des femelles de remplacement. Un sexué mâle, isolé de sa reine, n'aurait aucune influence. Répétant dans le détail les expériences de LIGHT, il observa que les extraits aqueux ou méthyliques de têtes et de thorax, donnés en nourrissage à des larves, sont plus inhibiteurs, que des extraits d'abdomens ou de viscères. D'autre part, en disposant des sexués fonctionnels, de telle façon qu'ils offrent, soit leur tête, soit leur abdomen (cf. BUTLER) aux individus de deux colonies, il obtint une action inhibitrice totale, lorsque les femelles étaient présentes avec les mâles.

La phéromone serait, d'après cet auteur, localisée dans la tête, véhiculée par le transit intestinal et rejetée avec les excréments. De là, elle serait reprise par les individus et échangée entre eux.

Chez les Fourmis.

Chez les Fourmis, SCHNEIRLA (1953) montra, en expérimentant sur les *Eciton*, le très fort pouvoir d'attraction qu'exerce la reine sur les ouvrières. Son odeur spécifique est attractive pour tous les membres de la colonie. Des morceaux de papier buvard, gardés au contact d'une reine pendant un certain temps attirent très fort également les ouvrières, mais deviennent inattractifs lorsqu'ils sont exposés à l'air.

Lors de la supersédure de vieilles reines fonctionnelles, il note une diminution du pouvoir d'attraction de ces reines pour les ouvrières (BUTLER fait, rappelons-le, la même observation pour les Abeilles).

BIER (1954-56) observa que, chez la Fourmi *Leptothorax*, des ouvrières orphelines pondent beaucoup plus d'œufs que des groupes de même nombre munis d'une reine. Des ouvrières, séparées de leur reine, ne pondent pas d'œufs, si elles reçoivent chaque jour des ouvrières qui ont séjourné près d'une reine (cf. BUTLER). Chez *Formica rufa* il se produit, après éloignement de la reine, le même processus d'augmentation de la fertilité des ouvrières. Celle-ci n'apparaît d'ailleurs qu'au bout d'un certain laps de temps après le déplacement de la reine.

STUMPER (1956) décéla aussi l'existence d'une substance attractive chez *Lasius alienus* et *Pheidole pallidula*. Plus la reine est volumineuse, plus son léchage par les ouvrières est intense. Des supports (papier-filtre, éponge, moelle de sureau) imbibés d'extraits de reines fécondes, ont montré un pouvoir d'attraction très net sur les ouvrières. Pour d'autres espèces, les effets constatés furent douteux ou même négatifs : ces sécrétions attractives sembleraient donc être spécifiques de certaines espèces. Les extraits d'ouvrières ne présentèrent pas de pouvoir d'attraction. L'effet persiste assez longtemps : de 2 à 9 jours, selon les extraits.

Chez les Halictes.

Chez les Halictes, QUÉNU (1958) remarque que, dans les colonies de dernière année, un petit nombre d'ouvrières subit un certain développement de leurs ovaires et engendre des mâles, alors que, dans les colonies plus jeunes, les ovaires des ouvrières ne se développent pas, ce qui lui fait penser que les ouvrières sont normalement inhibées par la reine — cette inhibition s'affaiblirait vers la fin de la vie de celle-ci. De plus, l'absence de reine permettrait le développement ovarien complet de plusieurs ouvrières.

Ainsi, toutes ces données, qui ont dépassé maintenant le cadre de la pure hypothèse, mettent en évidence l'existence de phéromones d'un type particulier, dont les effets essentiels sont leur fort pouvoir d'attraction et d'inhibition du développement des organes génitaux. Il est possible — quoique pas encore démontré — qu'il s'agisse d'un groupe de substances très voisines ; mais il nous paraît difficile d'admettre, pour l'instant, qu'elles ne sont pas spécifiques d'une espèce donnée.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le pouvoir d'attraction qu'exerce une reine vivante sur les Abeilles de son entourage entraîne dans la ruche une série de processus complexes, dont les deux plus caractéristiques sont, d'une part, la non-construction de cellule royale et, d'autre part, l'absence d'ouvrières capables de pondre des œufs.

La non-apparition d'individus reproducteurs se manifeste de deux façons :

A. — Castration alimentaire.

Dans une colonie normale, qui possède une reine et un abondant couvain « ouvert », il n'y a pas ou très peu d'ouvrières pondeuses. Mais cet état se trouve réalisé aussi dans une colonie avec reine, sans couvain, lorsque celle-ci est mise dans l'impossibilité de pondre, ou encore dans une colonie orpheline, mais possédant de nombreuses jeunes larves, qu'on ajoute expérimentalement.

Dans ces conditions, il est très difficile de discerner la part qui revient à l'inhibition d'ordre alimentaire (nourrissement du couvain par les ouvrières) de celle qui revient à l'inhibition d'ordre chimique (action de la phéromone). C'est probablement la raison pour laquelle presque tous les auteurs qui étudièrent les causes de l'apparition des ouvrières pondeuses crurent pendant longtemps que la présence du couvain « ouvert » était le seul facteur responsable de la non formation des ouvrières pondeuses. D'ailleurs, nous ne voyons pas non plus, pour le moment, d'autres hypothèses qui puissent expliquer l'absence d'œufs dans les ovaires des ouvrières, qui s'épuisent à nourrir des larves en l'absence de reine.

Mais dans les conditions expérimentales, où nos Abeilles (moins nombreuses), mises en présence d'une reine vivante, reçoivent une abondante nourriture azotée, l'influence inhibitrice de la castration nutritive est plus délicate à admettre : les Abeilles peuvent consommer du pollen à volonté. Si cette inhibition existe, elle est beaucoup plus faible, comparée à celle d'une ruche normale : les Abeilles, à notre avis, s'épuiseraient moins à alimenter une reine qu'à nourrir un couvain important. Dans ce cas alors, l'importance de l'inhibition d'ordre chimique, due à la reine et à sa phéromone, est de beaucoup la plus importante et l'emporte sur la castration nutritive. Cela expliquerait pourquoi, dans les conditions de laboratoire, nous avons pu la mettre en évidence.

B. — Castration chimique.

L'étude des reines mortes, avec la suppression des activités trophallaxiques, démontre l'existence d'une phéromone attractive, répandue sur les téguments royaux. Les ouvrières, attirées par les reines, les lèchent et ne peuvent plus ensuite former

d'œufs dans leurs ovaires, bien qu'elles reçoivent une nourriture riche et abondante en protéines.

1° IMPORTANCE DE LA PERCEPTION DE LA PHÉROMONE PAR LES ANTENNES.

L'influence inhibitrice de la reine sur le développement des œufs dans les ovaires des ouvrières s'exerce d'une façon différente selon le type d'excitation sensorielle. L'intensité de la réaction, lorsque la substance royale est incorporée à la nourriture, apparaît plus faible que lorsqu'elle est déposée, à part, sur du papier-filtre. Dans ce dernier cas, le prélèvement de la substance par les ouvrières ne peut avoir lieu que si celle-ci est attractive et « parfumée », c'est-à-dire s'il existe, à côté de la phéromone I, des esters plus volatils : phéromone II, dont le mélange avec l'acide céto-9-décène-2-*trans* oïque (phéromone I) reconstitue l'odeur royale.

Cette odeur est perçue par les antennes, sur lesquelles sont situées de nombreux sensilla olfactifs et gustatifs ; et l'on connaît, depuis les travaux de VON FRISCH (1921), la grande sensibilité de l'Abeille aux saveurs et aux odeurs.

Par contre, les organes du toucher ne paraissent pas jouer de rôle important, au cours de ces processus, et la reconnaissance par les ouvrières de leur reine n'est pas nécessairement associée à sa forme. Il ne s'agirait donc pas d'un sens topochimique, comme l'entendent FOREL (1921) et GRASSÉ (1939) ; mais plutôt d'une chimio-réception de contact, au sens de DETHIER (1948).

L'odeur des reines est indispensable dans la colonie pour que les ♀ viennent prélever la phéromone. En effet, cette odeur caractéristique n'agit qu'à des distances très faibles, et les ouvrières ne s'amassent jamais sur des supports imbibés d'extraits très attractifs, lorsqu'on les recouvre d'une toile métallique. L'odeur royale ne peut être comparée en puissance de diffusion à l'odeur sexuelle émise par des femelles de Papillons pour attirer leurs mâles. Il s'agit ici d'une attraction particulière *entre deux catégories de femelles*, ce qui semble très différent.

Pour forcer les ouvrières à consommer l'acide (inattentif par lui-même), inhibiteur de la construction des cellules royales, BUTLER est obligé de le présenter associé à du miel, sur des cadavres de reines préalablement « extraites ». Dans ces conditions, il obtient une inhibition de construction avec des doses de substances très faibles, de l'ordre de 0,13 γ par Abeille.

VOOGD a montré le peu d'activité des extraits royaux sur l'inhibition des œufs chez les ouvrières, lorsque ceux-ci étaient incorporés à la nourriture. Nos résultats confirment ces données et les précisent. L'absence d'activité sur les ovaires de la phéromone I et la mise en évidence, chez les reines âgées, vierges ou fécondes, de substances, dont les esters sont plus volatils que l'acide céto-9-décène-2-*trans* oïque, souligne l'importance, dans les conditions naturelles et expérimentales, de l'excitation olfactive, pour l'inhibition du développement des œufs dans les ovaires des ouvrières (stimulation sensorielle olfactive).

Il est difficile de savoir dans quelle mesure les sensations gustatives s'associent aux sensations olfactives ; mais nous supposons que l'enregistrement, par l'Abeille, de ces sensations, provoque, par voie réflexe, l'extention du proboscis et l'absorption de la phéromone.

2° IMPORTANCE DE L'ABSORPTION PAR LE TUBE DIGESTIF.

On ne connaît pas encore le mécanisme exact de la répartition de la substance attractive sur le corps des reines ; mais la contamination est certainement très rapide et peut s'effectuer de deux façons : 1° lorsque les reines se nettoient (BUTLER et SIMPSON, 1958) ; 2° lors des échanges trophallaxiques entre reines et ouvrières (PAIN).

La phéromone attractive adhère d'autant plus sur le corps de la reine que l'épicuticule, qui recouvre son tégument, est constitué par un mélange de cires et de paraffines, matériel particulièrement apte à retenir les odeurs (technique de l'enfleurage).

Le fait que nous ayons retrouvé la phéromone attractive dans les extraits d'ouvrières non orphelines confirme l'hypothèse de son prélèvement par les ouvrières et l'accumulation d'une certaine quantité de celle-ci dans leur corps. Étant donné qu'on ne la retrouve pas dans les extraits d'ouvrières orphelines, elle ne peut être transmise aux ouvrières que par la reine.

On suppose qu'une fraction de la phéromone passe dans l'intestin de l'ouvrière et, sous l'influence de nombreuses enzymes, dont une lipase, y subit une transformation complète. Les produits de dégradation, déversés dans la circulation, seraient véhiculés par le sang jusqu'au niveau des *corpora allata* et auraient pour effet de perturber leur sécrétion. Le ralentissement de l'activité des corps allates inhiberait la formation des œufs dans leurs ovaires.

On pourrait considérer l'action de la phéromone comme stabilisatrice du fonctionnement des *corpora allata*. Il est fort possible, comme l'a démontré L'HÉLIAS (1957), chez le Phasme, que les mécanismes des synthèses protéiques soient profondément affectés ; car il en est ainsi lors de l'extirpation des *corpora allata*.

Ces modifications de fonctionnement des *corpora allata* et, corrélativement, de l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières, seraient en partie sous la dépendance du cerveau. On sait à présent que différents stimuli, et en particulier le jeûne ou une mauvaise alimentation, exercent une influence directe sur les cellules neurosécrétrices de la *pars intercerebralis*. Il est possible qu'on se trouve en présence d'un double processus d'inhibition : l'un dû à la castration alimentaire, agissant sur les cellules du cerveau est freinant indirectement l'activité des *corpora allata*, l'autre, de nature chimique, agissant directement sur les *corpora allata*, dont le fonctionnement est déjà perturbé et ralenti par le proto-cérébron.

Mais si l'hypothèse d'une action de la phéromone sur les *corpora allata* est vraisemblable, en ce qui concerne l'ovogénèse, il est plus difficile d'admettre que ceux-ci jouent aussi un rôle dans les modifications du comportement, telles que la construction des cellules royales. Il semble bien qu'une excitation antennaire n'est pas indispensable pour obtenir un meilleur effet inhibiteur, et que la phéromone I, par l'intermédiaire des organes du goût (stimulation sensorielle gustative) agit directement sur le cerveau et coordonne les instincts de construction. On se trouverait en présence de deux mécanismes : l'un nerveux, agissant sur le comportement des cirières (inhibition de la construction des cellules royales) ; l'autre hormonal, agissant sur l'ovogénèse (inhibition du développement des œufs dans les ovaires).

C. — LE RÔLE DE L'OUVRIÈRE DANS LA FORMATION DE LA SUBSTANCE ROYALE.

L'influence des ouvrières est très grande. Deux hypothèses nous viennent à l'esprit : les ouvrières pourraient contribuer à l'élaboration de la phéromone, soit en distribuant à la reine, ou à sa larve, un précurseur, qui pourrait être l'un des constituants acides de la gelée royale, secrété par leurs glandes mandibulaires, soit en activant par leur présence les sécrétions mandibulaires des reines, qui se mettraient à produire davantage de phéromone. Le fait que les ouvrières élaborent dans leurs glandes mandibulaires un acide, dont la nature chimique n'est pas si éloignée de l'acide isolé des glandes mandibulaires des reines, nous fait pencher en faveur de la première hypothèse. La présence de petites quantités de phéromone I dans les glandes mandibulaires des reines naissantes nous fait supposer que celle-ci s'est formée à partir de la gelée royale qu'a reçue la larve. L'apparition des substances dont les esters sont plus volatils chez les reines âgées, correspondrait plutôt à des produits de transformation métabolique, d'origine exogène (pollen, par exemple), que les reines excrèteraient au fur et à mesure de leur vieillissement.

Enfin les ouvrières aident à la répartition de la substance royale, en la distribuant aux autres membres de la colonie, lors des échanges trophallaxiques. Dans ce cas, le mécanisme excitateur, enregistré par les antennes, est certainement très faible. La concentration de la substance royale dans le jabot des ouvrières est variable et dépend de la quantité de nectar accumulé dans celui-ci. Elle rendrait compte, dans une certaine mesure, des différences observées dans les pourcentages d'Abeilles aux ovaires contenant des œufs.

Il est probable que l'inhibition de l'ovogénèse est plus importante lorsque les ouvrières ont un contact direct avec leur reine, que lorsqu'elles reçoivent la phéromone par l'intermédiaire des autres ouvrières. Dans les conditions expérimentales, les chances sont plus grandes pour qu'un tel contact s'établisse entre la reine et tous les individus engagés avec elle.

RÉSUMÉ

Dans le présent travail, nous étudions le pouvoir attractif des reines (vivantes ou mortes) et leur influence inhibitrice, d'abord sur l'apparition des œufs dans les ovaires des ouvrières adultes et ensuite sur l'inhibition des cellules royales.

Ce pouvoir d'attraction et d'inhibition est dû à la présence d'une substance particulière (phéromone ou phéromone) à l'aspect huileux, stockée ou secrétée par les glandes mandibulaires des reines. Ces glandes présentent un fort pouvoir d'attraction, vis-à-vis de jeunes Abeilles (PAIN, 1959) inhibent la construction des cellules royales (BUTLER et SIMPSON, 1958) et le développement des ovaires (BUTLER, 1959).

Les méthodes utilisées pour contrôler ces trois effets, actuellement connus de la phéromone, sont les suivantes :

1° Le pouvoir attractif est évalué *en comptant toutes les 30 secondes (pendant 5 minutes) le nombre de jeunes ouvrières attirées* auprès des reines (vierges ou fécondes) ou auprès de supports imprégnés de phéromone (papiers-filtres). Pour l'appréciation des résultats, on effectue la moyenne des nombres maxima d'Abeilles attirées dans les différentes cagettes.

2° Le pouvoir inhibiteur sur le développement ovarien des ouvrières est apprécié en disséquant les ovaires d'un nombre déterminé d'Abeilles engagées, abondamment pourvues en pollen et en candi. On évalue les stades de leur ovogénèse (stades 1 à 5), selon qu'elles sont orphelines ou qu'on leur offre pendant toute la durée de l'expérience (15 jours) ou des périodes de temps limitées, des reines mortes ou vivantes, vierges ou fécondes, entières ou sectionnées, ou des supports imbibés d'extraits royaux. Nous considérons que *les ovaires n'ont pas été inhibés par la phéromone et ont réagi à la nourriture azotée dès qu'apparaît un œuf dans l'un des deux ovaires.*

Nous montrons l'importance du mode d'administration de la nourriture dans les conditions expérimentales. *La nourriture azotée (pollen), séparée de l'aliment sucré (candi) se rapprochant davantage des conditions naturelles, donne des résultats plus réguliers sur l'ovogénèse, à condition toutefois d'affamer en candi les Abeilles pendant quelques heures, afin de les obliger à consommer le pollen, imbibé ou non de différents extraits royaux.*

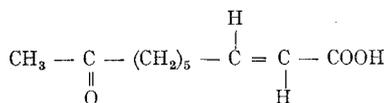
3° Le pouvoir inhibiteur sur la formation des cellules royales, est étudié *en comptant le nombre de ces cellules, dans des populations de 150 ouvrières adultes orphelines, d'âges indéterminés, nourries de pollen et de candi, dans lesquelles on introduit des morceaux de rayons clairs, bâtis, contenant des œufs, sur lesquels on attache les corps de deux ouvrières mortes, imbibées d'extraits royaux, ou du solvant seul, puis de sirop miellé pour attirer les Abeilles.*

Les ouvrières sont attirées par la phéromone proprement dite et la prélèvent même lorsqu'elle n'est pas associée au corps de la reine. Il ne s'agit donc pas d'un sens topo-chimique (FOREL, 1921 et GRASSÉ, 1939); mais d'une *chimio-réception de contact* (DETHIER, 1943) *en présence de la sécrétion odorante.*

Le mode d'action de la phéromone diffère selon qu'elle est ou qu'elle n'est pas associée à la nourriture (pollen et candi). Il semble que la stimulation antennaire, provoquée par la phéromone attractive (non associée à la nourriture) soit plus importante pour l'inhibition de l'ovogénèse que pour l'inhibition de la construction de cellules royales.

La nature chimique de la phéromone est complexe. Ce n'est pas un corps pur mais un *mélange d'acides.*

L'un d'eux a été isolé par BARBIER (1958) à partir des fractions actives (acides du pentane) de reines et d'ouvrières non orphelines, et par CALLOW et JOHNSTON (1959) de têtes de reines fécondes. La synthèse de cet acide a été réalisée en même temps (juin 1960) par ces mêmes auteurs à partir de la cycloheptanone (BARBIER) et de l'acide azélaïque (CALLOW et JOHNSTON). C'est l'acide céto-9 *décène-2-trans oïque* α β insaturé. Il se présente sous la forme de plaquettes blanches et répond à la formule :



1° *Il est inhibiteur de la construction des cellules royales à la dose de 0,13 γ par Abeille (BUTLER) et de 0,5 γ par Abeille (PAIN).*

2° *Il n'est pas attractif par lui-même; mais il est indispensable pour la reconstitution de l'odeur royale (BARBIER, PAIN, 1960). L'odeur royale a été reconstituée en mélangeant à l'acide céto-9... (phéromone I) des substances aux esters très volatils (phéromone II) mais non attractifs à eux seuls pour les ouvrières, obtenues par distillation (entre 20 et 60°C, sous 0,1 mm de pression), des fractions actives de reines, (acides du pentane). Deux de ces esters ont été identifiés dans un appareil à chromatographie gazeuse et correspondent aux positions des phénylacétate et phénylpropionate de méthyle (PAIN, HÜGEL et BARBIER, 1960).*

3° *Il n'inhibe pas la formation des œufs, chez les ouvrières, par ingestion ou par présentation sur le corps d'ouvrières mortes.*

Les glandes mandibulaires des reines adultes (vierges, fécondes ou bourdonneuses), qu'elles aient été au contact ou non avec des ouvrières, contiennent la phéromone I ainsi que la phéromone II. Les glandes mandibulaires des reines naissantes ne contiennent que des traces de phéromone I et non les substances aux esters très volatils (phéromone II). Ces substances apparaissent plus tard que la phéromone I. Cela explique l'absence du pouvoir d'attraction des reines naissantes. Ces résultats soulignent l'importance du facteur « attractif odorant », pour le prélèvement de la phéromone I par les ouvrières. D'autre part, nous trouvons aussi dans les glandes mandibulaires des reines, deux acides dicarboxyliques en C₉ et C₁₀: l'acide azélaïque et l'acide sébacique, dont les rôles n'ont pas été précisés.

Les glandes mandibulaires des ouvrières ne contiennent pas l'acide céto-9... (phéromone I) mais l'acide hydroxy-10 *décène-2-trans oïque*, α β insaturé, déjà isolé par BUTENANDT et REMBOLDT (1957) de la gelée royale et par BARKER, FORSTER et LAMB (1959) des glandes mandibulaires des ouvrières adultes. L'acide hydroxy-10... n'existe qu'à l'état de traces dans les glandes mandibulaires des ouvrières naissantes. Il se trouve en quantité plus importante dans les glandes mandibulaires des ouvrières adultes (orphelines et non orphelines) (BARBIER et PAIN, 1960). A côté de l'acide hydroxy-10... nous trouvons l'acide sébacique en C₁₀, déjà signalé dans les glandes mandibulaires des reines (fig. 4).

Il se pourrait que l'acide céto-9... corresponde à un produit d'oxydation de l'acide hydroxy-10... et que sa formation chez la reine soit liée directement à son nourrissage par les ouvrières.

La vitesse d'apparition de la phéromone attractive chez les reines vierges (en présence ou en absence d'ouvrières) est :

1° Une fonction de l'âge chez les reines isolées.

2° Une fonction du nombre d'ouvrières chez les reines accompagnées (fig. 5). Nous en concluons

que la présence des ouvrières n'est pas indispensable à la formation de la phéromone proprement dite; mais des groupes de plus en plus importants d'ouvrières accélèrent d'autant plus vite son apparition.

Les reines (vierges ou fécondes) possèdent des pouvoirs d'attraction et d'inhibition de l'ovogénèse variable selon leur âge, leur alimentation, le nombre des ouvrières qui les accompagnent, et selon qu'elles vivent libres ou claustrées. *Il semble qu'il existe un cycle annuel de la sécrétion de la phéromone* proprement dite. Le pouvoir d'attraction du tégument des reines mesurée par la méthode des papiers-filtres (chap VI), indique qu'il se produit une accumulation de la phéromone pendant l'hivernage. Celle-ci peut difficilement s'établir pendant la belle saison, à cause de l'activité importante des nourrices qui lèchent la reine beaucoup plus souvent. *L'attraction tégumentaire hivernal ne serait pas en rapport avec l'activité sécrétrice des glandes mandibulaires*, certainement plus importante pendant la belle saison (fig. 9).

Le pouvoir d'attraction des reines sur les ouvrières est si puissant que des échanges trophiques peuvent s'établir entre elles lorsque des toiles métalliques à mailles fines (1,5 mm), inférieures à la limite fixée par FREE et BUTLER pour les échanges ouvrières — ouvrières, les séparent. (Diagramme 1). Mais les échanges à travers les toiles, entre groupes d'ouvrières orphelines et non orphelines, se font de plus en plus rares, lorsque les reines sont accompagnées de groupes d'ouvrières de plus en plus importants. *Nous précisons alors la notion de groupe indépendant dont la formation supprime les échanges à travers la toile*. Nous constatons l'indépendance lorsque les reines sont accompagnées de groupes d'ouvrières supérieurs à 50. Alors la disparition des échanges trophiques favorise l'apparition des ouvrières pondueuses dans le compartiment orphelin (diagramme 2).

L'analyse des travaux de MÜSSBICHLER (fig. 10, 11, 12, 13), nous a permis de montrer que *l'inhibition de l'ovogénèse et celle de la construction des cellules royales ne sont pas des phénomènes tout à fait comparables*: ils se succèdent dans le temps. Ils n'exigent pas le même nombre d'ouvrières. Ils nécessitent des Abeilles d'âges différents.

La reine inhibe la production d'ouvrières pondueuses, par l'action de sa phéromone, et par castration nutritionnelle. Or, la castration due à la reine est plus faible, à notre avis, que la castration alimentaire exercée par l'ensemble du couvain.

Les reines vivantes exercent une action plus inhibitrice sur l'ovogénèse des ouvrières que les reines mortes (tableau VI).

L'existence de phéromones attractives et inhibitrices du développement d'autres sexués a été mise en évidence chez les Termites, les Fourmis et les Halictes; mais les chercheurs ne connaissent pas encore leur nature chimique. Il se pourrait que ces phéromones appartiennent au même groupe de substances.

Nous émettons l'hypothèse que l'excitation sensorielle olfactive et gustative des ouvrières déclenche par voie réflexe l'allongement de leur proboscis et provoque le prélèvement de la phéromone sur les téguments royaux. L'excitation gustative, enregistrée par le cerveau (mécanisme nerveux), déclenche les instincts de construction et d'inhibition de la formation des cellules royales. L'excitation olfactive (stimulation antennaire) renforcerait le processus de l'inhibition ovarienne, en ralentissant chez les ouvrières les sécrétions de leurs *corpora allata*, (mécanisme hormonal), déjà perturbées par la castration nutritionnelle, due au couvain et à la reine.

SUMMARY

The following is a study of the attractivity of queens (live or dead) and their inhibitory action, especially upon the development of eggs in the ovaries of adult bee workers, and also on the inhibition of queen cells construction.

The attractivity and inhibition are due to the presence of a particular oily substance (pheromone or pherormone) which is accumulated and or secreted by queens' mandibular glands.

These glands have a great attractive power upon young bee workers, (PAIN, 1959) as well as an inhibitory one on the construction of emergency queen cells (BUTLER and SIMPSON, 1958) and on ovarian development in the bee workers (BUTLER, 1959).

The three different physiological aspects of pherormone known so far have been studied by the following methods:

1) The attractivity was evaluated by counting the number of visits of young bees during 30 seconds in a period of 5 minutes to queens (virgins or fertilized) or to subjects impregnated with pherormone (filter-paper).

The average number of visits was computed from the maximal number of bees for each count, in the different cages.

2) The inhibitory effect upon the ovarian development in bee workers was determined by dissections of the ovaries of a fixed number of bees which were abundantly supplied with pollen and candy in their cages. The various stages of their ovogenesis (ranging from 1 to 5) have been evaluated in the

following experimental conditions : a) queenless workers ; b) queenright workers which were maintained during 15 days of less, in the presence of queens which were live or dead, virgins of fertilized, whole or sectioned and subjects impregnated with royal extracts.

The presence of one egg in an ovary was considered to be due rather to the influence of nutrition, than to the inhibitory action of pherormone.

We wish to point out the importance of food administration to the bees under experimental conditions. *The best results in ovogenesis were obtained when pollen was offered separately from candy, on condition that the bees have been deprived of candy for a few hours, thus being obliged to consume an ordinary pollen or one impregnated with different royal extracts.*

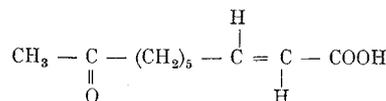
3) The inhibitory effect upon the construction of emergency queen cells have been studied by counting the number of these cells, in groups of 150 adult queenless workers of undetermined age, which have been fed on candy and pollen, in which are introduced pieces of young yellow combs containing eggs to which two dead bee workers have been attached and impregnated with a queen extract or with the solvent alone and subsequently with a honey sirup to attract the bees.

The bee workers are attracted by properly so called pherormone and consume it even when it is separated from the queen's body. This phenomenon is rather a *chemo-reception contact in presence of the odorous secretion* (DETHIER, 1948) than a topochemical instinct (FOREL, 1921 and GRASSÉ, 1939).

The mode of action of pherormone differs according to whether or not it is incorporated with the food. In the latter case, it seems that the antennal stimulation has greater influence upon the inhibition of ovogenesis than on the inhibition of queen cells construction.

The chemical nature of pherormone is complex : *it is a mixture of different acids ; one of which was isolated by BARBIER (1948) from the active fractions (pentane acids) of queens and of queenright workers, and by CALLOW and JOHNSTON (1959) from the heads of fertilized queens. The synthesis of this acid was simultaneously carried out (JUNE, 1960) by the above mentioned authors from cycloheptanon (BARBIER) and from azelaic acid (CALLOW and JOHNSTON).*

α β unsaturated 9-oxodec-2-enoic acid :



which has the following properties was isolated in the form of white flakes.

1) *It has inhibited queen cells construction at a concentration of 0,13 γ per bee (BUTLER) and 0,5 γ per bee (PAIN).*

2) *It is not attractive to the bees but it is indispensable for the reconstitution of the queen odour (BARBIER and PAIN, 1960).*

The queen odour has been reconstructed by mixing 9-oxodec-2-enoic acid (pherormone I), with highly volatile esters (pherormone II), which separately were not attractive to the bees. These were obtained by distillation (between 20°C and 60°C and 0,1 mm Hg pressure), from queen active fractions (pentane acids). Two of these esters were identified by gaz-chromatography and they correspond with the positions of methyl phenylacetate and methyl phenyl-propionate (PAIN, HÜGEL and BARBIER, 1960).

3) *It has not inhibited eggs formation in workers' ovaries, by ingestion or offering on dead workers.*

The mandibular glands of adult queens (virgins, fertilized and drone laying queens) which were in contact with bee workers or were isolated from them, contain the pherormone I as well as the pherormone II (substances composed of highly volatile esters.)

The mandibular glands of emerging queens contain only traces of the pherormone I and lack the pherormone II. The pherormone II appear later than the pherormone I and confirm the absence of any attractivity in emerging queens.

These findings emphasize the importance of the factor of odorous attraction in the absorption of the inhibitory pherormone by bee workers. On the other hand, we have found in the queens' mandibular glands, the two following dicarboxylic acids with 9 and 10 C.atoms : azelaic and sebacic acids, whose biological activity is still unknown.

The mandibular glands of bee workers do not contain 9-oxodec-2-enoic acid (pherormone I) but α β unsaturated 10-hydroxy- Δ^2 -deceanoic acid isolated by BUTENANDT and REMBOLDT (1957) from royal jelly and by BARKER, FOSTER and LAMB (1959) from the mandibular glands of adult bee workers. *In the mandibular glands of emerging bee workers there are only traces of 10-hydroxy- Δ^2 -deceanoic acid.* This acid is found in greater quantities in the mandibular glands of queenright and queenless adult workers (BARBIER and PAIN, 1960). Side by side with 10-hydroxy- Δ^2 -...- acid, we have found sebacic acid (with 10 C. atoms) present in the queens' mandibular glands (fig. n° 4).

It appears that 9-oxodec-2-enoic acid corresponds to a product which is due to the oxidation

of 10-hydroxy- Δ^2 -decanoic acid and its formation in queens depends upon the nutrition received from the bee workers.

The rate of the appearance of this attractive pheromone depends on the age of isolated virgin queens, whereas in the case of the accompanied ones it depends on the number of bee workers. We conclude that the presence of bee workers is not indispensable for the appearance of the properly so called pheromone, however, the greater the number of accompanying bees, the faster it is formed.

The queens (virgins and fertilized) possess powers of attraction as well as of inhibition of oogenesis, fluctuating according to their age, nutrition, number of accompanying workers and their freedom of movement.

There probably exists an annual cycle of the secretion of the properly so called pheromone. The tegumentary attractivity of queens when measured by the filter paper method (Chapter VI) indicates that during winter there is an accumulation of this pheromone, whereas during spring and summer its concentration decreases as a result of the great licking activity of nurse bees.

There is no relationship between the tegumentary attractivity during winter and the secretion of mandibular glands which is certainly more abundant during the summer (fig. n° 9).

The attractive power of queens upon bee workers is so intensive that even when they are separated by fine wire-gauzes of 1,5 mm (which are below the limits established by FREE and BUTLER for the nutritional exchanges between workers, (See Diagram, n° 1) there are nutritional exchanges between them.

The frequency of nutritional exchanges through the wire-gauze between queenless and queenright groups of workers depends upon the number of bee workers accompanying the queen. We introduce the notion of independent group from which the formation suppresses exchanges through the gauze. We have found that the queenright group becomes independent from the queenless one (i. e. there are no more nutritional exchanges between these two) when the number of bee workers in the first group is above fifty. And, as a consequence of the lack of these nutritional exchanges, laying workers appear in the queenless group (Diagram. n° 2).

We have found, while analysing MÜSSBICHLER'S work (fig. 10, 11, 12 and 13), that *the inhibition of oogenesis does not correspond to the inhibition of queen cells construction.* Each of these two phenomena occurs at a different time, and differs from the other in its specific requirements for the minimal number of bees of a particular age.

The queen inhibits the appearance of laying workers by the action of her pheromone and by nutritional castration. This nutritional castration by the queen, in our opinion, is weaker than the one exerted by the quantity of young brood.

The living queens exercise stronger inhibitory action upon the bee workers oogenesis, than the dead ones (table n° 6).

Attractive and sex inhibiting pheromones, have been found in Termites, Ants and Halictes; their chemical nature has not yet been established by research workers. It seems possible that all these pheromones belong to the same group of substances.

We suggest that the sensory, gustatory and olfactory excitation in bee workers cause a reflex which protrudes the proboscis and provokes the consumption of pheromone from the queen teguments. The gustatory excitation when received by the brain (nervous mechanism) unlatches the instincts of construction and inhibition of queen cells formation. The olfactory excitation (antennal stimulation) reinforces the ovarian inhibition and reduces the secretion of the corpora allata of bee workers (hormonal mechanism) which were already disturbed by the nutritional castration due to the brood and to the queen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit beschäftigen wir uns mit der Attraktivität lebender oder toter Königinnen und ihrer Hemmwirkung, besonders auf das Erscheinen von Eiern in den Ovarien erwachsener Arbeiterinnen, sowie auf die Verhinderung der Anlage von Weiselzellen.

Die Attraktivität und das Hemmvermögen sind durch das Vorhandensein einer spezifischen Substanz (Pheromon oder Pherormon) von öligem Aussehen bedingt, die durch die Mandibeldrüsen der Königinnen ausgeschieden oder gespeichert wird. Die Mandibeldrüsen zeigen eine grosse Attraktivität für junge Bienen (PAIN 1959), verhindern die Anlage von Weiselzellen (BUTLER und SIMPSON 1958) und die Entwicklung der Ovarien (BUTLER 1959).

Die Methoden zur Prüfung der drei heute bekannten Wirkungen der Pheromone sind folgende:

1. Die Attraktivität wird eingeschätzt, indem man alle 30 Sekunden (während 5 Minuten) die Anzahl junger Arbeiterinnen zählt, die von Königinnen (begattet oder unbegattet) oder von Stoffen die mit Pherormon getränkt wurden (Fließpapier) angezogen werden. Zur Schätzung der Resultate

wird das Mittel der Maximalzahl der Bienen verwendet, die zu den verschiedenen Käfigen angezogen wurden.

2. Die Hemmwirkung auf die Ovarienentwicklung wird eingeschätzt, indem man bei einer gewissen Anzahl eingeschlossener, mit Zuckerteig und Pollen versehener Bienen, die Ovarien herauspräpariert. Man schätzt den Zustand der Oogenese (Stadien 1-5) je nachdem, ob die Arbeiterinnen weisellos sind, oder ob ihnen während der ganzen Versuchsdauer (15 Tage), oder während begrenzter Zeitabschnitte tote oder lebende, unbegattete oder begattete, ganze oder zerschnittene Königinnen, oder mit Weiselextrakten getränkte Träger beigegeben wurden. Wir betrachten *die Ovarien als nicht gehemmt durch das Pherormon, und durch die stickstoffhaltige Nahrung zur Entwicklung angeregt, sobald ein Ei in einem der beiden Ovarien erscheint.*

Wir zeigen die Wichtigkeit der Art der Nahrungs-Darbietung unter experimentellen Bedingungen. *Eine Trennung des stickstoffhaltigen (Pollen) und zuckerhaltigen (Zuckerteig) Futters, was den natürlichen Verhältnissen entspricht, gibt regelmässige Resultate der Ovarienentwicklung, unter der Bedingung, dass man die Bienen einige Stunden hungern lässt (Zuckerteig), um sie zur Aufnahme des unveränderten, oder mit Weiselextrakten getränkten Pollens zu zwingen.*

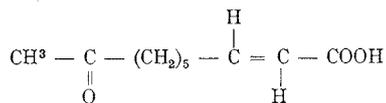
3. Die Hemmwirkung des Pherormons auf die Anlage von Weiselzellen wird untersucht, indem man *die Anzahl von diesen Zellen, in Populationen von 150 erwachsenen weisellosen Arbeiterinnen von unbestimmtem Alter, die mit Pollen und Zuckerteig ernährt, werden zählt.* In diesen Populationen werden Eier enthaltende Wabenstücke eingeführt, auf welchen zwei tote mit Weiselextrakten, oder dem Lösungsmittel allein getränkte Arbeiterinnen angeheftet werden. Um Bienen anzuziehen, werden die toten Körper mit Honigwasser getränkt.

Die Arbeiterinnen werden durch das eigentliche Pherormon angezogen und nehmen es auf, auch wenn es nicht an den Körper der Königin gebunden ist. Es handelt sich demnach nicht um einen topochemischen Sinn (FOREL, 1921 und GRASSÉ, 1939) sondern um *eine chemische Kontakt-Rezeption* (DETHIER, 1948) *in Gegenwart des Duft-Sekretes.*

Die Wirkungsart des Pherormons ist unterschiedlich je nachdem ob es an die Nahrung (Pollen oder Zuckerteig) gebunden ist oder nicht. Es scheint, dass die Fühlerstimulation, die durch den nicht ans Futter gebundene Attraktivstoff hervorgerufen wird, stärker auf die Hemmung der Oogenese als auf die Verhinderung der Anlage von Weiselzellen wirkt.

Die chemische Natur des Pherormons ist komplex. Es ist noch nicht rein, sondern *eine Mischung von Säuren.*

Eine davon wurde von BARBIER (1958) isoliert aus den aktiven Fraktionen (Pentansäure) von Königinnen und weiselrichtigen Arbeiterinnen und von CALLOW und JOHNSTON (1959) aus Köpfen begatteter Königinnen. Gleichzeitig (JUNI 1960) gelang den gleichen Autoren die Synthese dieser Säure, ausgehend von Cycloheptanon (BARBIER) und von der Äzelainsäure (CALLOW und JOHNSTON). *Die ungesättigte 9-oxo-decen-2-enon-Säure* $\alpha\beta$,



erscheint in Form weisser Plättchen.

1. *Sie wirkt hemmend auf die Anlage von Weiselzellen* in der Dosierung von 0,13 mcg pro Biene (BUTLER) und von 0,5 mcg pro Biene (PAIN).

2. *Sie ist an sich nicht attraktiv; sie ist jedoch unerlässlich für die Wiederherstellung des Weiselduftes* (BARBIER, PAIN 1960). Der Weiselduft konnte wiederhergestellt werden, durch eine Mischung der 9-oxo-decen-2-enon-Säure (pherormone I) mit den leicht flüchtigen, für Bienen getrennt nicht attraktiven Estersubstanzen, (pherormone II) die durch Destillation (zwischen 20 und 60 °C, unter 0,1 mm Druck) aus den aktiven Weiselfraktionen (Pentansäure) gewonnen wurden. Zwei dieser Ester wurden in einem Gaschromatographie-Apparat identifiziert und entsprechen dem Methyl-Phenylacetat und Phenylpropionat (PAIN, HÜGEL und BARBIER 1960).

3. *Sie hat keine hemmende Wirkung auf die Eierbildung in den Ovarien der Arbeiterinnen, weder durch Fütterung noch durch Verabreichung auf dem Körper toter Bienen.*

Die Mandibeldrüsen der erwachsenen Königin (begattet, unbegattet oder drohnenbrütig) enthalten, gleichgültig ob sie mit Arbeiterinnen in Kontakt waren oder nicht, pherormon I und die pherormon II. Die Mandibeldrüsen frisch geschlüpfter Königinnen enthalten nur Spuren von pherormon I und keine pherormon II. Die pherormon II erscheint später als die pherormon I, was das *Fehlen der Attraktivität bei frisch geschlüpften Königinnen* erklärt. Diese Resultate unterstreichen die Bedeutung des attraktiven Duft-Faktors für die Aufnahme des hemmenden Pherormons durch die Arbeiterinnen. Andererseits finden wir in den Mandibeldrüsen der Königin zwei Dicarboxyl-Säuren in der C₉ und C₁₀-Lage, die Äzelainsäure und die Sebacinsäure, deren Bedeutung noch nicht genauer bekannt ist.

Die Mandibeldrüsen der Arbeiterinnen enthalten keine 9-oxo-decen-2-enon-Säure (pherormon

1), aber ungesättigte 10-hydroxy- Δ^2 -decen-Säure α^2 , die bereits von BUTENANDT und REMBOLD (1957) aus Königinnen-Futtersaft und von BARBIER, FORSTER und LAMB (1959) aus Mandibeldrüsen erwachsener Arbeiterinnen isoliert wurde. *Die 10-hydroxy- Δ^2 -decen-Säure kommt in den Mandibeldrüsen frisch geschlüpfter Arbeiterinnen nur in Spuren vor.* Man findet sie in grösseren Mengen in den Mandibeldrüsen erwachsener Arbeiterinnen (weisellos oder weiselrichtig) (BARBIER und PAIN 1960). Neben 10-hydroxy- Δ^2 -decen Säure finden wir Sebacinsäure in C_{10} -Lage, die schon aus den Mandibeldrüsen der Königinnen bekannt ist (Abb. 4.).

Es wäre möglich, dass die 9-oxo-decen-2-enon-Säure einem Oxydationsprodukt der 10-hydroxy- Δ^2 -Säure entspricht, und dass ihre Entstehung bei der Königin, direkt mit ihrer Fütterung durch die Arbeiterinnen verbunden ist.

Das Auftreten des attraktiven Pheromons bei unbegatteten Königinnen (in Gegenwart oder Abwesenheit von Arbeiterinnen) ist :

1. eine Funktion des Alters, bei isolierten Königinnen.
2. eine Funktion der Zahl der Arbeiterinnen bei begleiteten Königinnen (Abb. 5). Wir schliessen daraus, dass die Gegenwart von Arbeiterinnen für die Bildung des eigentlichen Pheromons nicht unbedingt notwendig ist..Das Erscheinen des Pheromons wird jedoch durch wachsende Arbeiterinnengruppen entsprechend beschleunigt.

Königinnen (unbegattet oder begattet) besitzen je nach ihrem Alter, ihrer Ernährung, der Zahl der Begleitbienen und je nachdem ob sie frei oder im Käfig leben, ein verschieden starkes Attraktions- und Hemmungsvermögen. *Es scheint ein Jahreszyklus der Ausscheidung des eigentlichen Pheromons zu existieren* : die Attraktivität des Teguments der Königinnen, geprüft mit der Fliesspapier-Methode (Kap. 6), zeigt, dass das Pheromon während der Ueberwinterung angereichert wird. Während der warmen Jahreszeit kann es nicht zu solch einer Anreicherung kommen, wegen der Aktivität der Ammenbienen, welche die Königinnen viel häufiger belecken. *Die Oberflächenattraktivität während des Winters steht nicht in Beziehung zur Sekretion der Mandibeldrüsen*, die sicher stärker ist während der warmen Jahreszeit (Abb. 9).

Die Attraktivwirkung der Königin auf Arbeiterinnen ist so stark, dass trophischer Austausch zustande kommt auch bei Trennung durch feinmaschiges Drahtgitter (1,5 mm), dessen Maschenweite unter dem von FREE und BUTLER angegebenen Grenzwert liegt (Diagramme 1). Der Austausch durch Gitter, zwischen weisellosen und weiselrichtigen Arbeiterinnen-Gruppen wird immer seltener, je grösser die Bienengruppen sind, welche die Königin begleiten. *Wir prägen den Begriff der selbständigen Gruppe*, von der an, die Kontakte durch das Gitter verschwinden. Wir stellen eine Selbständigkeit der Völker fest, wenn die Königinnen von Bienengruppen von mehr als 50 Individuen begleitet sind. Das Verschwinden der trophischen Austausche begünstigt dann das Erscheinen eierlegender Arbeiterinnen im weisellosen Abteil (Diagramm 2).

Die Prüfung der Arbeiten von Müssbichler (Abb. 10, 11, 12, 13) hat uns zu zeigen erlaubt, dass *die Hemmung der Ovarienentwicklung und diejenige der Anlage von Weiselzellen nicht ganz vergleichbare Phänomene sind* : sie folgen sich in der Zeit. Sie erfordern nicht die gleiche Anzahl von Arbeiterinnen. Sie benötigen Bienen verschiedenen Alters.

Die Königin verhindert das Erscheinen von Drohnenmütterchen nicht nur durch ihr Pheromon, sondern auch durch Futterkastrierung. Die, durch die Anwesenheit der Königin bedingte Kastrierung ist nach unserer Meinung schwächer, als die durch die Brut ausgeübte Futterkastrierung.

Lebende Königinnen üben auf die Oogenese der Arbeiterinnen eine stärkere Hemmung aus als tote. (Tab. No. 6).

Das Vorkommen attraktiver und die Entwicklung anderer Geschlechtstiere hemmender Pheromone wurde bei Termiten, Ameisen und Halictus-Arten nachgewiesen ; die Forscher kennen jedoch ihre chemische Natur noch nicht. Es könnte sein, dass es sich um eine ähnliche Substanzengruppe handelt.

Wir stellen die Hypothese auf, dass die Erregung durch den Tast-, Geruch und Geschmack sinn der Arbeiterinnen auf dem Reflexweg das Ausstülpen der Proboscis und die Aufnahme des Pheromons von der Königinnenoberfläche auslöst. Die Geschmacks-erregung, durch das Gehirn registriert (nervöser Mechanismus), löst die Instinkte zur Anlage und zur Verhinderung der Weiselzellen aus. Die Gerucherregung (Fühlerstimulation) würde den Prozess der Hemmung der Ovarienentwicklung bei den Arbeiterinnen steigern, durch eine Verlangsamung der Sekretion ihrer Corpora allata (hormonaler Mechanismus), die schon durch eine von Brut und Königin bedingte Futterkastrierung gestört ist.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN M. D., 1957. Observations of honeybees examining and licking their queen. *Brit. J. Anim. Behav.*, **5**, 81-84.
- BARBIER M., 1958. (voir référence avec Lederer, 1960).
- BARBIER M., LEDERER E., 1960. Structure chimique de la « substance royale » de la reine d'abeille (*Apis mellifica*). *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 4467-4469.
- BARBIER M., LEDERER E., NOMURA T., 1960. Synthèse de l'acide céto-9 décène-2-trans oïque (substance royale) et de l'acide céto-8 nonène-2-trans oïque. *C. R. Acad. Sc.*, **251**, 1133-1135.
- 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. Sc.*, **250**, 3740-3742.
- BARBIER M., SCHINDLER O., 1950. Isolierung von-24-Methylencholesterin aus Königinnen und Arbeiterinnen der Honigbiene (*Apis mellifica* L.). *Hel. Chim. Acta.*, **42**, 219. 1998-2005.
- BARKER S. A., et al., 1959. Identification of 10. H. Δ^2 decenoic acid in royal jelly. *Nature*, **183**, 996-997.
- BARKER S. A., et al., 1959. Biological origin and configuration of 10 Hydroxy- Δ^2 -decenoic acid. *Nature*, **184**, 634.
- BETHE A., 1932. Vernachlässigte Hormone. *Die Naturw.*, **11**, 177-181.
- BIER K., 1954. Über dem Einfluss der Königin auf die Arbeiterinnen fertilität in Ameisenstaat. *Ins. Soc.*, **1**, 7-19.
- BIER K., 1956. Arbeiterinnenfertilität und Aufzucht von Geschlechtstieren als Regulationsleistung des Ameisenstaates. *Ins. Soc.*, **3**, 177-184.
- BUTENANDT A., REMBOLD H., 1957. Über den Weizelzellenfuttersaft der Honigbiene. *Hoppe-Seyl. Z.* **308**, 284-9.
- BUTLER C. G., 1954. The importance of « queen substance » in the life of a honeybee colony. *Bee World.*, **35**, 9, 169-176.
- BUTLER C. G., 1954. The method and importance of the recognition by a colony of honeybees (*Apis mellifera*) of the presence of its queen. *Trans. R. Ent. Soc. Lond.*, **105**, 11-29.
- BUTLER C. G., 1955. The role of « queen substance » in the social organization of a honeybee community. *Amer. Bee J.*, **95**, 275-279.
- BUTLER C. G., 1956. Some further observations in the nature of « queen substance » and of its role in the organization of a honeybee (*Apis mellifera*) community. *Proc. R. Ent. Soc. Lond. (A)*, **31**, 12-16.
- BUTLER C. G., 1956. Some recent advances in apicultural research. *Ann. Review. of Ent.*, **1**, 281-298. (communication personnelle de SIMPSON J.).
- BUTLER C. G., 1957. The control of ovary development in worker honeybee (*Apis mellifera*). *Experientia* **13**, 256.
- BUTLER C. G., 1959. The source of the substance produced by a queen honeybee (*Apis mellifera* L.) which inhibits development of the ovaries of the workers of her colony. *Proc. R. Ent. Soc. Lond.*, (A) **34**, 137-138.
- BUTLER C. G., CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., 1959. Extraction and purification of « queen substance » from queen bees. *Nature*, **184**, 1871.
- BUTLER C. G., GIBBONS A. D., 1958. The inhibition of queen rearing by feeding queenless worker honeybees (*Apis mellifera*) with an extract of « queen substance ». *J. Ins. Physiol.*, **2**, 61-64.
- BUTLER C. G., SIMPSON J., 1958. The source of the queen substance of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Proc. E. Ent. Soc. Lond.*, (A), **33**, 120-122.
- BUTTEL-REEPEN H. V., 1915. Leben und wesen der Bienen. Vieweg und Sohn. Braunschweig.
- CALLOW R. K., JOHNSTON N. C., 1960. The chemical constitution and synthesis of queen substance of honeybees. *Bee world.*, **41**, (6), 152-153.
- CARLISLE D. B., BUTLER C. G., 1956. The « queen substance » of honeybees and the ovary inhibiting hormone of crustaceans. *Nature*, **177** (4502) 276-277.
- CASTLE G. B., 1934. The experimental determination of caste differentiation in termites. *Science.*, **80**, 314.
- CHAUVIN R., 1952. Sur le déterminisme de l'effet de groupe chez les Abeilles. *Phys. Comp.*, **1**, 282-287.
- CHAUVIN R., 1960. Les substances actives sur le comportement à l'intérieur de la ruche. *Ann. Abeille* **3**, (2), 185-197.
- CHAUVIN R., PAIN J., 1956. Le développement des ovaires des ouvrières d'abeilles et l'ectohormone des reines. *Experientia*, **12**, 354.
- DADANT C., 1893. Langstroth on the hive and the honeybee. 2^e éd. Hamilton, Illinois.
- DETHIER V. G., 1948. Chemical Insect Attractants and Repellents. Vol 1, 289. Maple press company, York, P. A., U. S. A..
- DOBROVSKY T. M., 1955. The last rites of a virgin queen or was she only salvaging the « queen substance »? *Amer. Bee J.*, **95**, (12), 471-482.
- DONHOFF E., 1857. Beiträge zur Bienenkunde 1857-1860, gesammelt und neu heraus-gegeben von Theodor Weippl. *Die Bibliothek des Bienenwirts*, **18**, Fritz Pfeningstorff, Berlin.
- EMERSON A. E., 1939. Social coordination and the superorganism. *Amer. Midl. Nat.*, **21**, 182-209.
- FOREL A., 1921. Le monde social des fourmis. Kundig. edit. Genève. **1**, 121, **2**, 9-26.

- FREE J. B., BUTLER C. G., 1958. The size of opertures through which worker honeybee will feed one another. *Bee world.*, **2**, 40.
- FRISCH K. V. von, 1921. Über den Sitz des Geruchsinnens bei Insekten. *Zool. Jb. Abt. Allg. Zool. u. Phys.*, **38**, 449-516.
- FYG W., 1950. Beobachtungen über die wirkungen der kohlenensäure-Narkose auf Arbeitsbienen. *Schweiz. Bienenztg*, **4**, 182.
- GONTARSKI H., 1938. Beobachtungen an Eierlegenden Arbeiterinnen. *Deuts. Imker.*, **4**, (12), 107.
- GONTARSKI H., 1950. Betäubungsmittel und ihre wirkung auf Königinnen und Arbeiterrinnen. *Bienenzücht.*, **3**, 4. pages
- GRASSE P. P., 1939. La reconstruction du nid et le travail collectif chez les termites supérieures. *J. Psychol. Norm. Path.*, Presses Univ. France, juillet-décembre, 370-396.
- GRASSÉ P. P., 1950. Structure et physiologie des sociétés animales. Colloque Int. C. N. R. S., vol. 1, 116.
- GRASSÉ P. P., LE MASNE M., 1938. (Voir référence GRASSÉ, 1950.)
- DE GROOT A. P., 1950. The influence of temperature and kind of food on the increase in the nitrogen-content of the young worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *Konink. Ned. Akad. Wetens. Proc.*, **53**, 560-566.
- DE GROOT A. P., 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee. *Phys. comp.*, **III**, 197-285.
- DE GROOT A. P., VOOGD C., 1954. On the ovary development in queenless worker bees. *Experientia.*, **10**, 384.
- HAMMANN E., 1957. Wer hat die Initiative bei den Ausflügen der Jungkönigin, die Königin oder die Arbeitsbienen? *Ins. Soc.*, **4**, 2, 91-106.
- HAYDAK M. H., 1940. Laying workers. *Glean. bee cult.*, **68**, 615.
- HESS G., 1942. Über den Einfluss der Weisellosigkeit und des Fruchtbarkeits-vitamins E auf die Ovarien der Bienenarbeiterin. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, **2**, 33-110.
- HUBER F., 1814. Nouvelles observations sur les Abeilles. 2^e ed. J. J. PASCHOUD, Paris, **1**, 147-168.
- KARLSON P., 1960. Pheromones. *Ergebn. Biol.*, **12**, 212-225.
- KARLSON P., BUTENANDT A., 1959. Pheromones (ectohormones) in insects. *Annu. Rev. Entom.*, **4**, 39-58.
- KARLSON P., LÜSCHER M., 1959. « Pheromones » : a new term for a class of biologically active substances. *Nature* (Lond.), **183**, 55-56.
- LAVIE P., PAIN J., 1959. Les rapports entre la substance antibiotique des reines et des ouvrières d'Abeilles, le développement ovarien et l'ectohormone. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, 1587-89.
- LAVIE P., PAIN J., 1959. Relation entre la substance attractive, le facteur antibiotique et le développement ovarien chez la reine d'Abeille, *Apis mellifica*. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, 3753-3755.
- LECOMTE J., Contribution à l'étude du comportement agressif chez *Apis mellifera* L. Thèse (sous presse). *Ann. Abeille*.
- LEUENBERGER F., 1928. Die Biene Sauerländer et Co, Aarau, 108-125.
- L'HELIAS C., 1957. Action du complexe rétro-cérébral sur le métabolisme chez le phasme (*carausius morosus*). *Bul. biol.* Thèse. 1-96.
- LIGHT S. F., 1944. Experimental studies on ectohormonal control of the development of the supplementary reproductives in the termite genus *Zootermopsis*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, **43**, 413-454.
- LUSCHER M., 1952. Die Produktion und Elimination von Ersatz-Geschlechtstieren bei der Termite *Kaloterms flavicollis* Fabr. *Z. Vergl. Phys.*, **34**, 123-141.
- LUSCHER M., 1955. Zur Frage der Übertragung sozialer wirkstoffe bei termiten. *Naturw.*, **42**, 186.
- LUSCHER M., 1956. Die Entstehung von Ersatz-geschlechtstieren bei der termite *Kaloterms flavicollis* Fabr. *Ins. Soc.*, **3**, 119-128.
- LUSCHER M., 1956. Hemmende und fördernde Faktoren bei der Entstehung der Ersatz-geschlechtstiere bei der Termite *Kaloterms flavicollis* Fabr. *Rev. Suisse Zool.*, **63**, 261-267.
- MAURIZIO A., 1946. Beobachtungen über die Lebensdauer und den Futtermittelverbrauch gefangen gehaltener Bienen. *Beih. Schweiz. Bienenztg.*, **2**, 13. 1-44.
- MAURIZIO A., 1954. Pollenernährung und Lebensvorgänge bei der Honigbiene. *Landw. Jb. Schweiz.*, **68**, 2, 155-182.
- MELAMPY R. M., Mac GREGOR S. E., 1959. Nutritional value of certain foods for the adult honeybee. *J. Econ. Ent.*, **32**, 721-725.
- MÜSSBICHLER A., 1952. Die Bedeutung äusserer Einflüsse und der corpora allata bei der Afterweiselenstehung von *Apis mellifica*. *Z. Verg. Physiol.*, **34** (3), 207-221.
- PAIN J., 1954. Sur l'ectohormone des reines d'Abeilles. *C. R. Acad. Sc.*, **239**, 1869-1870.
- PAIN J., 1954. La « substance de fécondité » dans le développement des ovaires des ouvrières d'Abeilles (*Apis mellifica* L.). Critique des travaux de MÜSSBICHLER. *Ins. Soc.*, **1**, 59-69.
- PAIN J., 1955. Influence des reines mortes sur le développement ovarien des jeunes ouvrières d'Abeilles (*Apis mellifica* L.). *Ins. Soc.*, **2**, 35-43.
- PAIN J., 1956. Mesure du pouvoir inhibiteur et de l'attractivité de l'ectohormone des reines d'Abeilles — différences individuelles. *C. R. Acad. Sc.*, **242**, 1080-1082.
- PAIN J., 1956. Le développement des ovaires des ouvrières des Abeilles et l'ectohormone des reines. *Experientia.*, **12**, 354-357.
- PAIN J., 1956. Sur l'ectohormone des reines d'Abeilles. *Ins. Soc.*, **3**, 199-202.
- PAIN J., 1959. Étude de l'apparition de l'attractivité chez les reines vierges d'Abeilles. *C. R. Acad. Sc.*, **248**, 3211-3212.
- PAIN J., 1960. De l'influence du nombre des Abeilles engagées sur la formation des œufs dans les ovaires de l'ouvrière. *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 2629-2631.
- PAIN J., BARBIER M., 1960. Mise en évidence d'une substance attractive extraite du corps des ouvrières d'Abeilles non orphelines (*Apis mellifica* L.). *C. R. Acad. Sc.*, **250**, 1126-1127.
- PAIN J., BARBIER M., 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. Sc.*, **250**, 3740-3742.

- 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. Sc.*, **251**, 1046-1048.
- PAIN J., VERGE J., 1950. Contribution à l'étude de l'ovaire des ouvrières d'Abeilles. *L'Apiculteur*, **94**, 45-53.
- PEREPELOVA L. I., 1928. Biology of laying workers the oviposition of the queen and swarming. (1929) *Bee World.*, **10**, 69-71, (transl. from opitnaia Paseka, 1928, 214-217).
- PICKENS A. L., 1932. Observation on the genus *Reticulitermes* Holmgren. *Pan. Pacif. Ent.*, **8**, 178-180.
- QUENU C., 1958. Sur la possibilité d'une inhibition des ouvrières par la reine chez *Halictus marginatus*. *C. R. Acad. Sc.*, **245**, 1102-1104.
- RIBBANDS C. R., 1949. The foraging method of individual honeybees. *J. Anim. Ecol.*, **18**, 47-66.
- SCHNEIRLA T. C., 1953. The army ant queen : keystone in a social system. *Bull. Un. Int. E. Ins. Soc.*, **1**, 29-41.
- SHINIEVA V. A., 1953. Faits nouveaux pour l'élevage des reines. *Pchelovodstvo*, **5**, 22-28.
- SENDLER O., 1940. Vorgänge aus dem Bienenleben vom Standpunkte der Entwicklungs-physiologie. *Z., Wiss. Zool.*, **153**, 29-82.
- STUMPER R., 1956. Sur les sécrétions attractives des fourmis femelles. *C. R. Acad. Sc.*, **242**, 2457.
- TUENIN I. A., 1926. Concerning laying workers. *Bee World.*, **8**, 90.
- VOOGD C., 1955. Inhibition of ovary development in worker bees by extraction fluid of queen. *Experientia.*, **11**, 181.
- VOOGD C., 1956. The influence of a queen on the ovary development in worker bees. *Experientia.*, **12**, 199.
- VOOGD C., 1959. How worker bees perceive the presence of their queen. *Z. Vergl. Physiol.*, **41**, 527-582. (in english).
- VUILLAUME M., 1958. Techniques d'élevage de reines. Le premier stade : élevage des cellules royales (Étude critique). *Ann. Abeille*, **3**, 189-196.
- WEAVER N., LAW J. H., 1960. Heterogeneity of Fatty Acids from Royal Jelly. *Nature.*, 187, 938.
- WOODROW A. W., 1941. Some effects of temperature, relative humidity, confinement and type of food on queen bees in mailing cages. *U. S. Dep. Agr. Bur. Ent. Plan. Quar. E.*, **529**, 13.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

SUR QUELQUES FACTEURS ALIMENTAIRES,
ACCÉLÉRATEURS DU DÉVELOPPEMENT DES ŒUFS
DANS LES OVAIRES DES OUVRIÈRES D'ABEILLES
(*Apis mellifica* L).

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 15 mars 1961
Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PÉRÈS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,
Jean SARRAILH.

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVIÈRE.

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 10-5-1961.

Dépôt légal : 2^e trimestre 1961 *N^o d'impression : 387.*