



Communication chimique et régulations sociales dans la colonie d'abeilles (*apis mellifera* L.)

Alban Maisonnasse

► To cite this version:

Alban Maisonnasse. Communication chimique et régulations sociales dans la colonie d'abeilles (*apis mellifera* L.). Biologie animale. Université d'Avignon, 2010. Français. <NNT : 2010AVIG0320>. <tel-00586843>

HAL Id: tel-00586843

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00586843>

Submitted on 18 Apr 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON

Discipline : Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement par :

Alban MAISONNASSE

Le 7 décembre 2010

COMMUNICATION CHIMIQUE ET
REGULATIONS SOCIALES DANS LA COLONIE
D'ABEILLES (*Apis mellifera* L.).

Directeur de thèse : Dr. Yves LE CONTE

Membres du Jury

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Dr. Nicolas CHÂLINE
Pr. Abraham HEFETZ
Pr. Erika PLETTNER
Dr. Anne-Geneviève BAGNÈRES
Pr. Mohamed EL MAÂTAOUI
Dr. Yves LE CONTE

Université Paris 13, France
Université de Tel Aviv, Israël
Université Simon Fraser, Canada
CNRS de Tours, France
Université d'Avignon, France
INRA d'Avignon, France



Ecole doctorale
SIBAGHE



UMR 406 Abeilles et
Environnement



THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON

Discipline : Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement par :

Alban MAISONNASSE

Le 7 décembre 2010

COMMUNICATION CHIMIQUE ET
REGULATIONS SOCIALES DANS LA COLONIE
D'ABEILLES (*Apis mellifera* L.).

Directeur de thèse : Dr. Yves LE CONTE

Membres du Jury

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Dr. Nicolas CHÂLINE
Pr. Abraham HEFETZ
Pr. Erika PLETTNER
Dr. Anne-Geneviève BAGNÈRES
Pr. Mohamed EL MAÂTAOUI
Dr. Yves LE CONTE

Université Paris 13, France
Université de Tel Aviv, Israël
Université Simon Fraser, Canada
CNRS de Tours, France
Université d'Avignon, France
INRA d'Avignon, France



Ecole doctorale
SIBAGHE



REMERCIEMENTS

La thèse est une belle expérience, enrichissante, parfois dure mais surtout captivante et qui m'a fait avancer... Mais ce travail si particulier n'est possible qu'avec une équipe et un environnement idéal au labo et ailleurs... Voici donc le moment des remerciements qui, bien sûr resteront classiques, mais qui me sont importants car toutes les personnes ayant partagé avec moi un bout de chemin durant ces trois années auront été indispensables pour réaliser ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, **Yves Le Conte**, qui aura su me donner la passion des abeilles, de l'apiculture et de la compréhension de cet extraordinaire insecte. Je suis très reconnaissant qu'il m'ait fait confiance en me donnant ce sujet de thèse qui lui est cher et d'avoir bien évidemment encadré mon travail, se rendant disponible et à l'écoute malgré un emploi du temps serré. Il a su orienter mes recherches aux bons moments tout en me laissant de la liberté et une grande autonomie. Il a toujours été motivé et enthousiaste dans les différentes étapes de ce travail et m'a également fourni les supports scientifiques et techniques nécessaires.

Je tenais à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et de commenter cette thèse : Dr. **Nicolas Châline**, Pr. **Abraham Hefetz**, Pr. **Erika Plettner**, Dr. **Anne-Geneviève Bagnères**, Pr. **Mohamed El Maâtaoui**.

Je souhaite remercier tout particulièrement toutes les personnes qui ont rendu possible ce travail de recherche.

Tout d'abord l'équipe du laboratoire biologie et protection de l'abeille avec qui j'ai travaillé pendant plus de 3 ans dans un climat de bonne entente, de bonne camaraderie et de partage de savoir.

Je remercie tout particulièrement **Dominique Beslay** (Mlle chimie analytique) pour toute l'aide et la formation à l'analyse chimique des phéromones. Le GC n'a plus de secret pour moi, n'y les colonnes de silices... Merci pour ton aide précieuse, ta bonne humeur et de ton amitié.

Merci également à **Didier Crauser** (Skycrouseur ou M. apiculture) pour m'avoir formé à l'apiculture, m'avoir aidé dans les manips de terrains avec les petites abeilles !! Grace à tes conseils, mon rucher se porte bien ! Merci pour tes compteurs, ta disponibilité et les abeilles naissantes...

Je remercie également **Jean Marc Bécard** (M. informatique) pour ton aide au niveau des commandes et de l'informatique. Merci de ton gout des surnoms et de l'Histoire qui m'auront bien fait rire...

Je remercie également les posts-docs. **Jean Christophe Lenoir**, pour tes conseils vertueux qui m'ont permis de démarrés ma thèse sur de bonnes bases, mais aussi pour tes conseils et tes remarques très précieux et bien sûr de ta convivialité et de ton soutien. **Cédric Alaux** pour tes orientations pragmatiques et très utiles des expérimentations et des publications, merci aussi pour les moments rugbylistique. **Cynthia McDonnell** merci de m'aider pour la langue de Shakespeare, ta disponibilité pour la rédaction des articles aura été précieuse. Merci à vous trois pour m'avoir aidé, par vos récentes expériences, à mieux comprendre les rouages d'une thèse.

Merci à mon associé de doctorat **Claudia Dussaubat** pour ton aide, ta bonne humeur et ton Français Chilien qui m'aura fait très plaisir. Merci de m'avoir impliqué dans ta sphère *Nosema* et ton travail sur les reines qui est passionnant !!

Je tiens à remercier les chercheurs et étudiants étrangers de passages dans notre laboratoire qui m'auront donné une vue de leurs recherches, de leurs pays et de leurs habitudes. Je tiens tout particulièrement à remercier **Marion Ellis** pour ton amitié et ta générosité. Le temps que tu m'accordes et l'opportunité que tu m'as donné en m'invitant à la conférence à Sacramento. Merci également à **Thomas Münz** et **Claudia Groh** pour les interactions pour le projet HFSP, la dissection de cerveau et votre convivialité. Merci également à **Wei Yu** qui m'aura fait découvrir la culture chinoise, **Amro Zayed** pour sa découverte de la pétanque, **Daniel** et **Hunter** les petits américains et toutes les autres personnes que le labo m'a permis de rencontrer.

Je remercie également tous les étudiants et les CDD du laboratoire qui m'ont aidé à la mise en place et aux suivis des expériences. Mais également à la bonne ambiance, l'agitation, les pétanques, les gâteaux (nombreux) qu'ils ont su mettre en œuvre durant les étés de manip. Les chimistes **Nicolas Boyer**, **Vincent Marteau**, **Lauren Thomazella** et **Horiya Amaach** pour leur sérieux et leurs compétences. Les biologistes **Aurelie Baldy**, **Mohammed Najar**, **Christophe DeBourg**, **Fanny Mondet**, et tout les autres pour qui les comptages d'abeilles et l'infection avec *Nosema* n'ont plus de secret. Merci également à **Martin** et **Claire Le Conte** pour leur amitié et leur aide à la dissection des ovaires. J'ai une pensée particulièrement émue pour **Thomas Le Conte** avec qui le travail était toujours plaisant, ses blagues, son entrain et sa bonne humeur sont pour moi le reflet de sa personnalité.

Cette équipe qui s'agrandit chaque année m'a permis de travailler sereinement et dans une ambiance conviviale à mon projet, je vous remercie très chaleureusement.

Je remercie également les autres membres des équipes voisines. L'équipe du dessous, du laboratoire toxicologie environnementale et notamment **Luc Belzunces** pour m'avoir accueilli dans son unité. Egalement **Jean Luc Brunet**, **Sylvie Tchamitchian**, **Marianne Cousin**, **Patricia Guillot**, **Claude Collet**, **Aklesso Kadala**, **Ciril Videau**... pour leur sympathie. Et merci à l'équipe d'à coté du laboratoire pollinisation **Bernard Vaissière**, **Nicolas Morison**, **Guy Rodet**, **Rémy Chifflet**... Mais également **Corinne Chêne** notre secrétaire, **Colette Pélissier** notre documentaliste et les apiculteurs **Jean Aptel** et **Jean Paul Vermandere**. Merci également à l'**Unité Expérimentale** Environnement et Agronomie d'Avignon pour les manip sur le terrain.

Je tiens également à remercier les collaborateurs de ce travail. Notamment les chimistes **Guy Costagliola**, **Christian Gines**, **Anne Genevive Bagnères**, **Jean-Marie Bessiere** et **Sylvie Sérino** pour les caractérisations et les dosages de phéromones aux GCMS. **Erika Plettner** pour ses commentaires précieux pour mes recherches et d'être à l'origine du projet **HFSP (Human Frontier Science Program)** qui a permis le financement de ma thèse. **Chloë Dibos**, **Severine Suchail** et **Mohammed El Maâtaoui** pour la collaboration sur la caractérisation des composés chimiques présents dans le pollen. **Christophe Gadenne** et les membres de mon comité de thèse pour l'attention que vous avez portés à mes travaux de recherches. Votre collaboration m'aura été d'une grande aide pour réaliser ce travail.

La thèse ne se réalisant pas sans un cadre serein et chaleureux à l'extérieur du labo. Je remercie ma **grande famille** de l' Ardèche, Drome et Isère en passant par la Lozère, mes **frères**, et mes **amis**, notamment mes voisins aixois **Math** (voisin de thèse ☺) et **No** avec qui les soirées et les week-ends sont toujours festifs (PAFS) !!, **les Pacoulains**, **Fab** et **Virg**, **Co**, **Yo** et **Marie**, **Remy** et tous les autres... Merci aussi à toute la bande de la rénovation de l'**Orgonnaise** !!

Je terminerai en remerciant tout particulièrement mes **parents** pour m'avoir soutenu dans mon travail et dans mes choix, et **Julie** qui je pense est ma clé de voute, dans mon travail et dans ma vie.

SOMMAIRE

PRESENTATION GENERALE.....	- 2 -
CHAPITRE 1 : PHEROMONES ET REGULATIONS SOCIALES.....	- 5 -
I- LA COMMUNICATION PAR LES PHEROMONES.....	- 5 -
A- Evolution de la définition d'une phéromone.....	- 6 -
B- Origine et réception des signaux chimiques.....	- 7 -
C- Spécificité du signal.....	- 7 -
D- Association des phéromones avec d'autres signaux de communication.....	- 8 -
E- Différentes phéromones ?	- 8 -
II LA VIE SOCIALE DE LA COLONIE D'ABEILLES DOMESTIQUES <i>APIS MELLIFERA</i>	- 10 -
A- Une société.....	- 10 -
B- La colonie d'abeilles.....	- 11 -
a- Les individus	- 11 -
b- Le cycle de vie	- 12 -
III LA COMMUNICATION CHIMIQUE DANS LA VIE SOCIALE DE LA COLONIE.....	- 15 -
A- Défense du nid	- 15 -
B- Orientation.....	- 16 -
a- Phéromone de Nasonov	- 16 -
b- Phéromone de recrutement.....	- 17 -
C- Reconnaissance spécifique	- 17 -
D- Cohésion du nid par la reine.....	- 18 -
E- Entretien du couvain.....	- 20 -
F- Division du travail	- 21 -
a- Division du travail au niveau de la reproduction.....	- 22 -
b- Division du travail entre les ouvrières.....	- 25 -
Le polyéthisme lié à l'âge.....	- 25 -
Flexibilité : une clé dans la réussite de ces sociétés.....	- 26 -
Importance du ratio nourrices / butineuses	- 27 -
Mécanismes associés à la maturation comportementale.....	- 28 -
Phéromones et division du travail des ouvrières	- 31 -
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	- 36 -
CHAPITRE II CARACTERISATION DE LA PHEROMONE DES BUTINEUSES, L'OLEATE D'ETHYLE : TRANSMISSION, DYNAMIQUE ET IMPACT DU STRESS SUR SA PRODUCTION.	- 41 -
DISTRIBUTION OF THE FORAGER PHEROMONE (ETHYL OLEATE) IN THE HONEY BEE COLONY	- 42 -
NOSEMA SPP. INFECTION ALTERS PHEROMONE PRODUCTION IN HONEY BEES (<i>APIS MELLIFERA</i>).....	- 58 -
CHAPITRE III LA QMP EST-ELLE LA PHEROMONE CENTRALE DE LA COLONIE D'ABEILLES ?	- 67 -
NEW INSIGHTS INTO HONEY BEE (<i>APIS MELLIFERA</i>) PHEROMONE COMMUNICATION. IS THE QUEEN MANDIBULAR PHEROMONE ALONE IN COLONY REGULATION?	- 68 -
CHAPITRE IV IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE PHEROMONE LARVAIRE : LE E-β-OCIMENE, ET SES EFFETS DANS LES REGULATIONS SOCIALES DE LA COLONIE.	- 86 -
A SCIENTIFIC NOTE ON E-B-OCIMENE, A NEW VOLATILE PRIMER PHEROMONE THAT INHIBITS WORKER OVARY DEVELOPMENT IN HONEY BEES	- 87 -
E-B-OCIMENE, A VOLATILE BROOD PHEROMONE INVOLVED IN SOCIAL REGULATION IN THE HONEY BEE COLONY (<i>APIS MELLIFERA</i>).....	- 93 -

CHAPITRE V DISCUSSION GENERALE	- 111 -
I- PHEROMONES ET REGULATIONS SOCIALES.....	- 112 -
<i>A- Régulation de la reproduction des ouvrières.....</i>	<i>- 112 -</i>
<i>B- Régulation de la maturation comportementale.....</i>	<i>- 113 -</i>
<i>C- Théories de la maturation comportementale.....</i>	<i>- 114 -</i>
<i>D- Complexité de la communication chimique.....</i>	<i>- 117 -</i>
a- Première théorie : un signal honnête ou un contrôle forcé.....	- 117 -
b- Seconde théorie : une syntaxe précise dans la communication de l'abeille.....	- 120 -
II PERSPECTIVES DE TRAVAIL.....	- 126 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 130 -

LISTE DES FIGURES (hors articles)

FIGURE 1 : PHEROMONES MODIFICATRICES ET INCITATRICES (MODIFIEE D'APRES WYATT, 2003).....	-9-
FIGURE 2 : CADRE D'UNE RUCHE D'ABEILLE, AVEC AU CENTRE DU COUVAIN OPERCULE, PUIS DES LARVES, DU POLLEN ET DU MIEL AUX EXTREMITES	-12-
FIGURE 3 : UN ESSAIM (PAR CEDRIC ALAUX).....	-13-
FIGURE 4 : CYCLE DE VIE D'UNE COLONIE D'ABEILLES (D'APRES WILSON, 1971).....	-14-
FIGURE 5 : LISTE DES 9 COMPOSES DE LA PHEROMONE ROYALE DE LA REINE.....	-19-
FIGURE 6 : FORMULES CHIMIQUES DES 10 COMPOSES DE LA PHEROMONE DE COUVAIN (ESTERS METHYLIQUES ET ETHYLIQUES).....	-21-
FIGURE 7 : PHEROMONES PERMETTANT LA REGULATION DES OVAIRES DES OUVRIERES	-23-
FIGURE 8 : POLYETHISME LIE A L'AGE CHEZ L'ABEILLE DOMESTIQUE (<i>APIS MELLIFERA</i>) (D'APRES MICHENER, 1974).....	-27-
FIGURE 9 : TAUX DE VG ET DE JH CHEZ L'ABEILLE DURANT SON DEVELOPPEMENT COMPORTEMENTAL.....	-29-
FIGURE 10 : A : NOURRICE EN TRAIN DE S'OCCUPER DU COUVAIN B : BUTINEUSES REVENANT A LA RUCHE	-31-
FIGURE 11 : REGULATION DE L'EQUILIBRE BUTINEUSES / NOURRICES PAR LES DIFFERENTS ACTEURS DE LA COLONIE.....	-34-
FIGURE 12 : RECAPITULATIF SCHEMATIQUE DES RESULTATS DU CHAPITRE II	-65-
FIGURE 13 : RECAPITULATIF SCHEMATIQUE DES RESULTATS DU CHAPITRE III	-84-
FIGURE 14 : RECAPITULATIF SCHEMATIQUE DES RESULTATS DU CHAPITRE IV	-109-
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES RESULTATS OBTENUS	-111-
FIGURE 16 : LES DIFFERENTS COMPOSES PHEROMONAUX IDENTIFIES AYANT UNE ACTION SUR L'INHIBITION DES OVAIRES OUVRIERES (LES POINTILLES INDIQUENT UNE EMISSION PLUS FAIBLE).....	-112-
FIGURE 17 : REGULATION DE LA MATURATION COMPORTEMENTALE DES OUVRIERES PAR DIFFERENTS ACTEURS DE LA COLONIE ET LES DIFFERENTS SIGNAUX CHIMIQUES MIS EN JEU (LOW = FAIBLE QUANTITE AND HIGH = FORTE QUANTITE).....	-113-
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES RENTRANT EN JEU DANS LA MODIFICATION DU COMPORTEMENT SOCIAL CHEZ L'ABEILLE (ADAPTEE DE ROBINSON <i>ET AL.</i> , 2008).....	-116-
FIGURE 19 : PRODUCTION D'EO PAR LES DIFFERENTS ACTEURS DE LA COLONIE (LES ABEILLES VERTES SONT PARASITEES PAR <i>NOSEMA</i> SPP. LES FLECHES INDIQUENT LES QUANTITES SUPPOSEES D'EO PRODUIT PAR LES INDIVIDUS ET TRANSFERER PAR LE POLLEN).....	-122-
FIGURE 20 : PRODUCTION DES DEUX PHEROMONES LE E- β -OCIMENE (EN BLEU) ET LA BEP (EN ROUGE) PAR LES DIFFERENTS STADES LARVAIRES.....	-123-
FIGURE 21 : DYNAMIQUE DES PHEROMONES DANS LA COLONIE D'ABEILLES <i>APIS MELLIFERA</i> (MODIFIE DE ALAUX <i>ET AL.</i> , 2010B).....	-125-

LISTE DES TABLEAUX (hors articles)

TABEAU 1 : DEGRES DE SOCIABILITE (MODIFIE D'APRES WILSON, 1971)	- 11 -
---	--------

GLOSSAIRE

BEP : Brood Ester Pheromone (phéromone du couvain composée d'esters)

CCD : Colony Collapse Disorder (Syndrome d'effondrement des colonies)

CHC : Cuticular Hydrocarbons (Hydrocarbures cuticulaires)

EO : Ethyl Oleate (Oléate d'éthyle)

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry (Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse)

HOB : methyl p-hydroxybenzoate

HPG : Hypopharyngeal Glands (Glandes Hypopharyngiennes)

HVA : 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol

JH : Juvenile Hormone (Hormone juvénile)

MAB : Middle age bees (abeille d'intérieur n'ayant plus d'intérêt dans le soin au couvain)

MG+ : Mandibular Glands intact (Glandes Mandibulaires intacts)

MG- : Mandibular Glands extirpated (Glandes Mandibulaires retirées)

QMP : Queen Mandibular Pheromone (Phéromone des glandes mandibulaires de la reine)

QRP : Queen Retinue Pheromone (Phéromone de cour émise par la reine)

SPME : Solid Phase Micro Extraction (Microextraction en phase solide)

Vg : Vitellogenin (Vitellogénine)

9-ODA : (E)-9-oxodec-2-enoic acid

9-HDA : both enantiomers of 9-hydroxydec-2-enoic acid

Présentation générale

Présentation générale

La société d'abeilles domestiques (*Apis mellifera*) possède une structure sociale au sein de laquelle interagit des dizaines de milliers d'individus dans un espace confiné. Ces individus reposent une partie de leur socialité sur la **communication chimique**. La communication de l'abeille montre que les réponses comportementales et physiologiques des individus aux signaux phéromonaux sont complexes (synergies des molécules, transmissions différentes, effets antagonistes, contexte). A titre d'exemple, plus de 50 substances, provenant de la colonie sont connues pour interférer dans le fonctionnement de cette société.

Malgré une connaissance approfondie de la communication chimique chez l'abeille avec, par exemple, les premières **phéromones** modificatrices identifiées chez cet insecte, de nombreux travaux restent à entreprendre pour interpréter ce système de communication si particulier.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés : à **caractériser** la dynamique et la transmission d'une molécule phéromonale connue, **identifier** de nouveaux composés phéromonaux et **comprendre** la redondance des signaux chimiques de cette société. Pour cela nous avons étudié la communication chimique des **butineuses**, du **couvain** et de la **reine** dans les régulations sociales de la colonie.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une revue bibliographique afin d'avoir une vue d'ensemble de la communication par les phéromones, de la société d'abeilles, et de l'impact des phéromones dans les régulations sociales de la colonie. Une problématique incluant les objectifs de cette thèse termine ce chapitre.

Ce manuscrit sera ensuite scindé en trois chapitres.

Le second chapitre étudie la caractérisation des traits de l'histoire de vie d'une phéromone. Le laboratoire a mis en évidence l'effet d'une phéromone des butineuses, l'oléate d'éthyle, sur l'inhibition du développement comportemental des ouvrières de la colonie. Nous avons caractérisé la dynamique de production et la transmission de cette molécule. En outre, dans le cadre de la compréhension de l'affaiblissement des colonies, nous avons également travaillé

sur l'impact de stress (maladie, pesticide) sur la production de cette phéromone dans la colonie.

Dans le troisième chapitre, nous avons analysé la communication chimique de la reine pour comprendre si son langage phéromonal est constitué d'une seule phéromone complexe, la phéromone royale des glandes mandibulaires ou, s'il existe un deuxième système phéromonal redondant des effets de la phéromone royale.

Le chapitre 4 est consacré à l'identification d'une nouvelle phéromone volatile du couvain, le E- β -ocimène. Sa dynamique de production est analysée ainsi que ses effets sur les ouvrières de la colonie d'abeilles.

Dans une cinquième partie, nous résumerons brièvement les principaux résultats obtenus. Et dans une discussion générale, nous synthétiserons ces résultats dans la communication chimique au niveau des régulations sociales au sein de la colonie d'abeilles. Puis, les perspectives qui découlent de ces travaux seront énoncées.

Chapitre 1 : Phéromones et régulations sociales

Chapitre 1 : Phéromones et régulations sociales

I- la communication par les phéromones

Le terme communication est défini dans la plupart des encyclopédies comme un échange d'information entre individus. Pour les êtres humains, c'est une partie majeure de leurs interactions sociales. Ils communiquent par la parole, l'écrit, les signes, le corps, le braille et par beaucoup d'autres moyens culturels et technologiques. Et il est maintenant certain que les hommes utilisent aussi des odeurs corporelles pour communiquer (Cornwell *et al.*, 2004; Wyatt, 2003).

Un acte de communication n'est pas toujours manifeste ou évident car souvent aucune entité visuelle ne passe d'un individu à l'autre, de sorte qu'il n'est pas toujours possible de savoir quand se produit l'échange d'informations. Pour un étranger d'une autre planète qui pourrait arriver sur Terre sans connaître nos langues et nos coutumes, il lui serait très difficile de reconnaître un brassard noir, un clin d'œil... en tant que formes de communications humaines. Lorsque nous étudions la communication des insectes, nous nous retrouvons également dans la même situation. La seule façon de distinguer une communication entre individus passe par la recherche de preuves d'un changement dans le comportement, ou de la physiologie d'un autre individu (McFarland, 1985).

Les éthologistes définissent la communication animale comme une action ou une condition de l'organisme qui modifie le comportement ou la physiologie d'un autre organisme (Wilson, 1970; Wyatt, 2003). Ainsi, un insecte peut communiquer par des signaux émis (production de bruit, d'un signal lumineux ou chimique) ou le signal peut être simplement une partie inhérente de la constitution physique de l'insecte (modèle d'aile, couleur du corps, ou signature chimique).

Les insectes communiquent pour différentes raisons (Free, 1987; Wyatt, 2003) :

- La facilitation de l'accouplement
- La localisation ou l'identification d'un membre du sexe opposé
- Le rapport de menace ou de soumission
- La reconnaissance de la parenté ou la reconnaissance coloniale
- L'établissement et maintien d'un territoire
- Le mimétisme
- La distribution spatiale des individus (agrégation ou dispersion)
- L'avertissement d'un danger, déclenchement d'une alarme
- L'identification de l'emplacement de la nourriture ou d'autres ressources
- L'avertissement de sa présence
- ...

Les insectes dépendent très fortement des signaux chimiques par rapport aux autres formes de communication. Basés sur l'origine de l'émission et sur le receveur, ces signaux chimiques peuvent être divisés en deux grands groupes :

- **Les allélochimiques** : signaux qui sont émis d'un animal d'une espèce vers un membre d'une espèce différente (Whittaker, Feeny, 1970).
- **Les phéromones** : signaux chimiques qui transportent l'information d'un individu à un autre membre de la même espèce (Free, 1987; Karlson, Luscher, 1959).

La communication chimique intraspécifique joue un rôle essentiel dans le comportement sexuel et la vie sociale des insectes.

A- Evolution de la définition d'une phéromone

Le terme phéromone dérive du grec « pherein » qui signifie transférer, et de « hormon » voulant dire exciter ou stimuler. Les phéromones sont très souvent classées par fonction, comme par exemple les phéromones sexuelles ou encore d'agrégation.

Plus précisément, une phéromone est définie comme une substance sécrétée à l'extérieur d'un individu et reçue par un ou plusieurs individus de la même espèce qui, en réponse, modifieront leurs comportements et/ou leurs physiologies (Karlson, Luscher, 1959).

Aujourd'hui, la définition du mot « phéromone » a évolué depuis la définition de Karlson et Luscher : une phéromone peut être un mélange de différentes substances et sa transmission peut se faire à distance mais aussi par contact ou ingestion, directement de l'émetteur au récepteur. Le mode d'action des phéromones dépend de leur nature chimique et de leur volatilité ou de leur solubilité, propriétés qui conditionnent leurs durées de vie (Slessor *et al.*, 2005a).

Les phéromones sont utilisées par de nombreux être vivant : les mammifères terrestres, les insectes et y compris les poissons et les crustacés sous-marins (Wyatt, 2009). Les phéromones sont nombreuses et sont rarement composées d'une molécule, mais plutôt d'une combinaison de molécules spécifiques à l'espèce émise dans une proportion précise (Slessor *et al.*, 2005a).

B- Origine et réception des signaux chimiques.

Les molécules utilisées dans les signaux chimiques sont majoritairement synthétisées *denovo* par des cellules sécrétrices. Mais certaines molécules phéromonales peuvent provenir de l'action de micro-organismes sur des composés synthétisés par l'animal, ou de l'alimentation (Brossut, 1996). Elles peuvent être stockées dans des glandes avant d'être émises ou être directement émises après avoir été produites.

La réception de signaux chimiques se fait majoritairement *via* le système olfactif périphérique composé de cellules sensorielles spécialisées, les chimiorécepteurs, qui reçoivent les molécules phéromonales (Brossut, 1996). La barrière entre chimioréception de distance, de contact, olfaction et gustation est parfois étroite, car certains composés sont peu ou non volatils. La reconnaissance d'une odeur implique une succession d'événements qui se situe à trois niveaux : le niveau moléculaire où s'établit l'interaction spécifique entre le stimulus et le système récepteur, le niveau cellulaire où s'effectue le codage olfactif et le niveau central où se fait la reconnaissance globale du message qui conduira à l'acte comportemental ou physiologique.

C- Spécificité du signal

La spécificité du signal peut être très faible comme, par exemple, pour les phéromones d'alarme ou les phéromones sexuelles, qui peuvent co-évoluer chez différentes espèces (Wyatt, 2003), le signal chimique aura alors une spécificité inter-espèces. A l'opposé, certains

signaux chimiques sont très particuliers comme les signaux de reconnaissance des individus d'une même colonie d'insectes (ex : les hydrocarbures cuticulaires) qui sont différents d'une colonie à une autre, pourtant de la même espèce (Le Conte, Hefetz, 2008). Mais la plupart des signaux chimiques ont une spécificité propre à l'espèce.

La spécificité d'une phéromone se fait par les molécules qui la composent et par les proportions de chacune de ces molécules émises à un instant précis. Dans le cas de phéromones de colonies d'insectes, dans le nid, la concentration phéromonale d'une molécule varie en fonction du nombre d'individus émetteurs et fait varier la réponse des individus récepteurs. La spécificité d'une phéromone vient alors du nombre d'individus émetteurs.

D- Association des phéromones avec d'autres signaux de communication

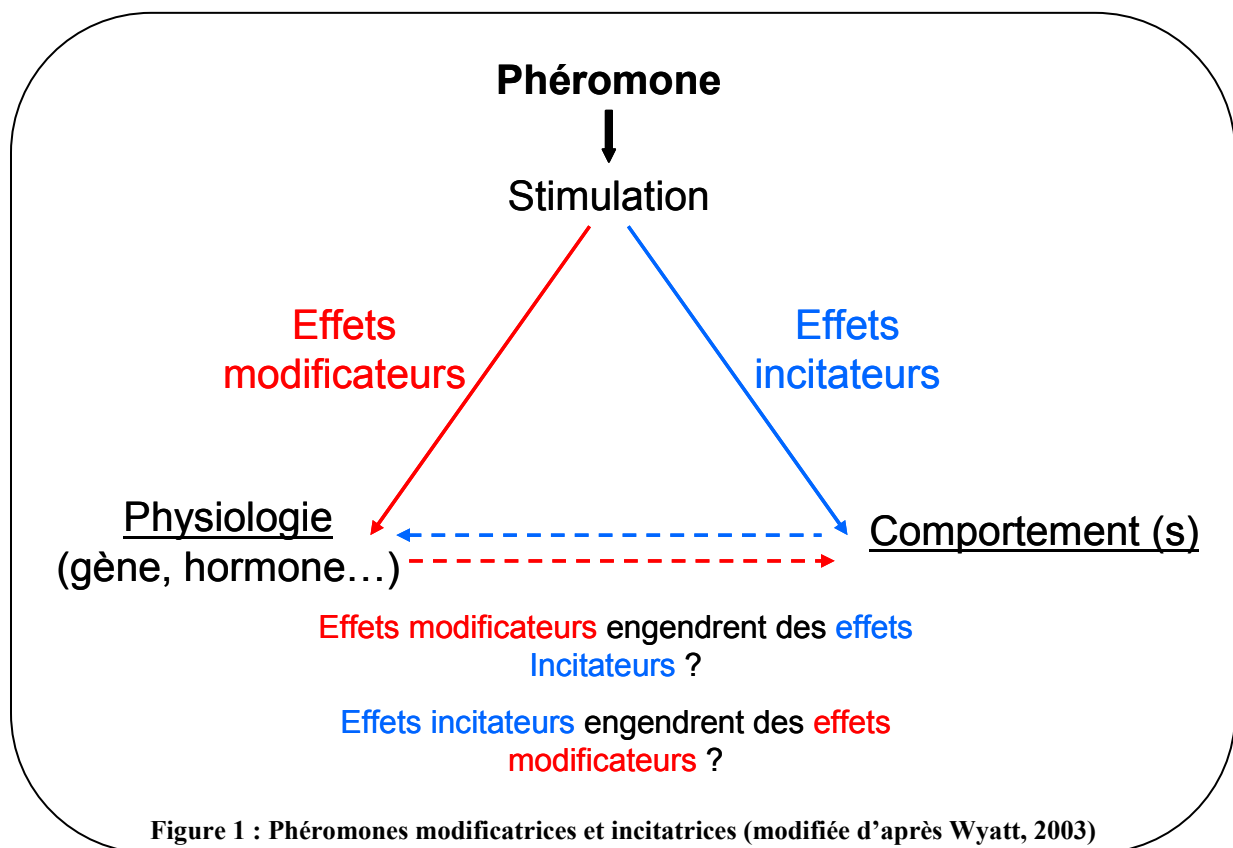
La communication par les signaux chimiques est l'un des différents modes de communication utilisé. D'autres signaux existent notamment chez les insectes, comme l'utilisation des vibrations : le « stop signal » (stoppe la danse en huit des butineuses chez *Apis mellifera*) ou le « buzz signal » (déclenchement de l'essaimage chez *Apis mellifera*) (Nieh, 2010; Rangel *et al.*, 2010). Certains signaux communicatifs non chimiques produits en même temps qu'une phéromone peuvent être importants pour la redondance du message, pour moduler l'intensité du signal, ou être nécessaires pour induire le comportement. Chez *Apis mellifera*, la danse frétillante des abeilles butineuses communique l'emplacement d'une source importante de nourriture aux ouvrières du nid (Frisch, 1967). En dansant, les abeilles produisent et libèrent deux alcanes et deux alcènes qui accroissent le recrutement des butineuses (Thom *et al.*, 2007).

E- Différentes phéromones ?

Le système de communication chimique utilisé par les animaux est complexe. Deux groupes de phéromones ont été décrits, les phéromones incitatrices (releaser) et modificatrices (primer). Une phéromone incitatrice déclenche immédiatement une réponse comportementale de l'individu récepteur, alors qu'une phéromone modificatrice modifie à plus long terme la physiologie (système endocrinien, reproducteur...) chez l'individu receveur (Wilson, Bossert, 1963). La caractérisation des phéromones modificatrices est plus difficile car le temps de réponse de ce type de stimulus peut être long et difficilement quantifiable. Il est

quelque fois difficile d'associer un changement graduel de la physiologie d'un individu avec un contact précoce d'un composé chimique (Le Conte, Hefetz, 2008).

De plus, il a été démontré que des phéromones incitatrices peuvent également modifier la physiologie de l'individu. La distinction entre les deux catégories de phéromones devient alors difficile (Fig. 1). Par exemple, chez l'abeille (*Apis mellifera*), la phéromone royale mandibulaire a des actions incitatrices comme l'attraction des ouvrières pour permettre le comportement de cour mais aussi des actions sur la physiologie des individus comme l'inhibition des ovaires des ouvrières (Slessor *et al.*, 2005a). Egalement chez l'abeille (*Apis mellifera*), la phéromone d'alarme était compartimentée dans le groupe des phéromones incitatrices. Récemment des études ont montré qu'elle n'induit pas seulement une réponse rapide de défense mais affecte à long terme les ouvrières dans leur comportement de défense et provoque des changements dans l'expression des gènes de leur cerveau (Alaux, Robinson, 2007).



Les phéromones sont intéressantes par leurs modes d'émission, de perception, de modification du comportement et de la physiologie. Un grand nombre d'interactions se fait par le biais des phéromones dans le règne animal, du fait de la grande proportion d'espèces d'insectes. Une

grande variété de composés est utilisée pour ce type de communication mais, parfois, un même composé peut être utilisé par différentes espèces. Un exemple fascinant provient de l'éléphant et de plus de 140 espèces de papillons qui utilisent la même molécule comme phéromone sexuelle (Rasmussen *et al.*, 1996).

L'abeille domestique (*Apis mellifera*), est un modèle phare pour l'étude de l'écologie chimique. Depuis plus de 50 ans et la découverte du 9-ODA (9-oxodéc-2-énoïque acid), phéromone royale émise par la reine avec des effets puissants sur la colonie (Barbier, Lederer, 1960; Butler *et al.*, 1962; Pain, 1961; Slessor *et al.*, 2005a), de nombreuses études ont été entreprises pour comprendre ce système de communication, ce qui en fait le modèle le mieux décrit parmi les insectes sociaux.

II La vie sociale de la colonie d'abeilles domestiques *Apis mellifera*

La société d'abeilles domestiques est établie dans un nid fonctionnel composé de milliers d'alvéoles hexagonales qui lui procure une interface pour les diverses interactions entre les individus. Le nid est aussi une structure optimale pour le développement de la colonie (développement larvaire, stockage de pollen et de miel). La clé du développement de cette société provient de la capacité du nid à réguler ses besoins en fonction de l'environnement à l'intérieur et l'extérieur du nid (Wilson, 1971).

A- Une société

Une colonie d'abeilles est une société composée de 20 000 à plus de 80 000 individus qui travaillent ensemble. Mais qu'est ce qu'une société et où se situe l'abeille *Apis mellifera* dans les différents degrés de socialité des animaux ?

Une société est formée d'individus qui appartiennent à la même espèce et qui coopèrent pour leur développement (Wilson, 1971).

Les insectes présentent différents degrés de socialité résumés dans la table 1. Les insectes sociaux qui présentent les plus hauts degrés de socialité sont les insectes eusociaux qui possèdent trois caractéristiques fondamentales (Michener, 1969) :

- Les individus de la même colonie coopèrent dans l'élevage des jeunes.
- Il existe une division du travail au niveau de la reproduction, avec plus ou moins d'individus stériles travaillant au bénéfice d'individus reproducteurs.
- Ces individus présentent un chevauchement d'au moins deux générations capables de contribuer ensemble au travail de la colonie.

Tableau 1 : Degrés de sociabilité (modifié d'après Wilson, 1971)

Degrés de sociabilité	Caractéristiques de socialité		
	Coopération à l'entretien du couvain	Différents états de fécondité	Chevauchement des générations
Solitaire	-	-	-
Quasi-social	+	-	-
Semi-social	+	+	-
Eusocial	+	+	+

Les abeilles domestiques *Apis mellifera* présentent le degré de sociabilité le plus élevé, et sont considérées comme une espèce eusociale. Ces abeilles peuvent être présentées comme une société complexe par la taille de la colonie, le rapport reines-ouvrières, la coopération entre individus, la complexité de la communication, la thermorégulation du nid ou encore la danse en huit permettant le recrutement de butineuses (Frisch, 1967).

B- La colonie d'abeilles

a- Les individus

La colonie d'abeilles est composée d'une reine, de mâles et d'ouvrières qui ont chacun des fonctions propres au sein de la société d'abeilles.

La reine est entourée d'une cour d'ouvrières qui lui prodigue les soins nécessaires, en la nourrissant avec une nourriture riche lui permettant d'assurer ses rôles principaux. Son rôle premier de pondreuse est indispensable à la survie de la colonie. A l'intérieur de son abdomen se trouvent deux ovaires de taille importante ainsi qu'une spermatèque (réserve de spermatozoïdes) faisant de la reine une puissante « machine à pondre ». La reine peut pondre environ 1500 à 2000 œufs par jour, permettant un renouvellement optimal des ouvrières. Son

deuxième rôle, permet la cohésion de la colonie par le biais de puissantes phéromones régulant la physiologie et le comportement des ouvrières (Winston, 1987).

Les mâles ont une fonction très importante de fécondation de la reine. Avec leurs yeux larges, de forts muscles pour le vol et un appareil reproducteur adapté, les mâles ont une morphologie faite pour l'accouplement et la fécondation en vol.

Les ouvrières peuvent se consacrer à toutes les tâches nécessaires au fonctionnement de la colonie, du soin au couvain à celui de la reine mais aussi au butinage ou à la défense du nid. Les ouvrières accomplissent toutes les tâches simultanément (Fig. 2), mais chaque ouvrière, à un temps donné, est spécialisée dans une tâche. Si des ouvrières sont nécessaires en plus grand nombre pour une tâche précise, la population d'ouvrières s'adapte.



Figure 2 : Cadre d'une ruche d'abeille, avec au centre du couvain operculé, puis des larves, du pollen et du miel aux extrémités

b- Le cycle de vie

Dans nos régions le cycle de vie annuel de la colonie d'abeilles débute en fin d'hiver, quand la colonie commence à se développer. Comme tout organisme, le but principal de la colonie est de se reproduire pour se développer (Seeley, 1995).

Pendant l'hiver, les abeilles se regroupent au centre de la colonie et forment une grappe pour maintenir une température adéquate de survie dans la ruche (33°C). À la fin des mois froids,

fin janvier, la colonie se développe : au début une centaine de jeunes ouvrières sont produites, mais quand les premières floraisons commencent (fruitiers), des milliers de cellules sont alors utilisées pour élever des larves. Durant le printemps, la colonie a une croissance maximale pouvant atteindre 80000 individus (Winston, 1987). À partir de cette période la colonie commence à préparer l'essaimage pour se reproduire. La reproduction est un procédé complexe. La colonie élève plusieurs nouvelles reines. Quand elles sont pratiquement matures, la colonie se divise : plus de la moitié des ouvrières part avec la reine fondatrice (essaim) former un nouveau nid : c'est l'essaimage (Fig. 3) (Seeley, 1995).



Figure 3 : Un essaim (par Cédric Alaux)

L'essaimage commence par un signal perçu par les ouvrières. L'augmentation de la taille de la colonie, du couvain, du nombre de jeunes ouvrières engendre une baisse de la diffusion des signaux chimiques de la reine. Les ouvrières construisent alors quelques cellules royales ; elles se présentent sous la forme de cellules larges et allongées qui dépassent du cadre. La reine pond un œuf dans chaque cellule royale, les larves émergentes sont ensuite nourries par une nourriture spéciale, la gelée royale, produite par les glandes hypopharyngiennes (HPG = Hypopharyngeal glands) et mandibulaires des nourrices durant les cinq stades larvaires. En comparaison, les larves d'ouvrières sont nourries avec de la gelée royale les 3 premiers jours de leur vie, puis avec de la bouillie larvaire (produite principalement par les glandes hypopharyngiennes des nourrices) durant les 2 derniers stades larvaires. Le développement d'une reine (16 jours) du stade œuf au stade adulte est très rapide en comparaison au développement des ouvrières (21 jours), et des mâles, (24 jours). Pendant la croissance des nouvelles reines, la vieille reine diminue sa ponte et réduit son abdomen. Juste avant l'émergence des nouvelles reines, l'ancienne reine quitte alors la colonie et essaime pour former une nouvelle colonie. Si la colonie est assez forte, des essaims secondaires peuvent alors se former, la première reine vierge qui émerge part avec un paquet d'abeilles plus ou moins important selon la vigueur de la colonie. Le nombre d'essaims secondaires varie selon la force de la colonie (Fig. 4) (Seeley, 1995; Wilson, 1971).

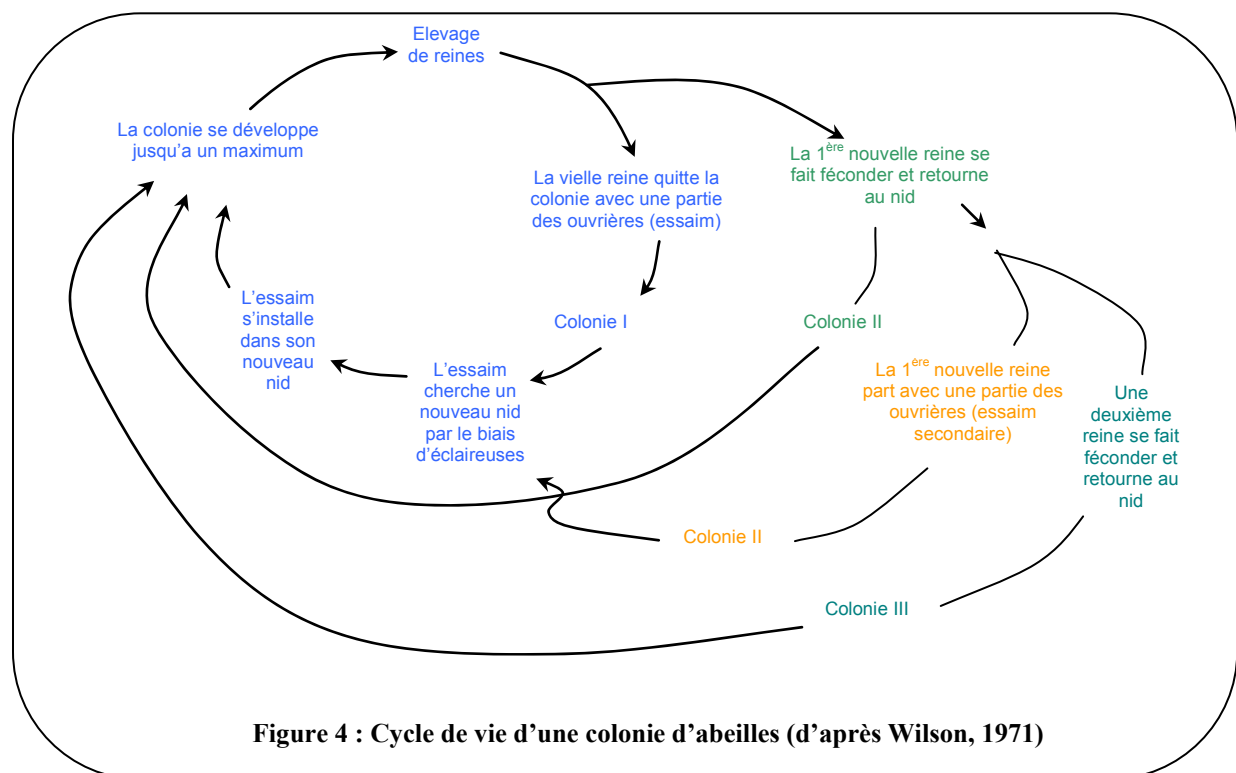


Figure 4 : Cycle de vie d'une colonie d'abeilles (d'après Wilson, 1971)

Après l'essaimage, la reine vierge qui naît dans la colonie détruit les cellules royales de ses sœurs, ou se bat à mort avec les autres reines émergentes. Quelques jours après, la nouvelle reine se fait féconder à l'extérieur de la ruche. Des congrégations de mâles de différentes colonies attendent la venue d'une reine pour essayer de la féconder. La reine vierge vole vers ces congrégations, et différents mâles la fécondent. La fécondation est rapide : le mâle rompt son appareil génital, permettant la libération du sperme dans la chambre génitale de la reine et meurt rapidement. La reine se fait féconder par environ 10 à 15 mâles en un à trois vols de fécondation, pour le reste de sa vie. Une fois sa fécondation terminée la reine retourne au nid et commence à pondre quelques jours plus tard. Cette nouvelle reine développera la colonie avec sa descendance.

III La communication chimique dans la vie sociale de la colonie

Les interactions entre les individus de la société sont en partie sous le contrôle de signaux phéromonaux. Ces phéromones donnent des informations précises afin de permettre l'homéostasie de la colonie, l'approvisionnement, la croissance, la défense et la reproduction, mais aussi la médiation des conflits sociaux (Le Conte, Hefetz, 2008). Dans la colonie, tous les individus émettent et sont sensibles aux signaux chimiques.

L'organisation sociale de la colonie est très flexible et les différentes régulations sociales et la vie de la société d'abeilles sont surtout guidées par des phéromones (Alaux *et al.*, 2010b) notamment la division de la reproduction et du travail.

A- Défense du nid

La colonie d'abeilles défend sa société pour de nombreuses raisons, le nid offrant une source riche de nourriture : le pollen, le miel et les individus eux-mêmes. Les prédateurs et les parasites sont nombreux à vouloir utiliser cette nourriture mais aussi les colonies voisines qui lors de disette peuvent venir piller la ruche. La défense du nid est nécessaire pour le développement de la colonie.

Le comportement de défense de la colonie commence généralement par l'émission de la phéromone d'alarme par les abeilles gardiennes à l'entrée de la ruche, ce qui incite alors d'autres abeilles à se déplacer à l'entrée pour protéger la ruche. De plus, un mélange de

substances est libéré par la glande à venin des ouvrières lorsqu'elles piquent, ce qui permet le recrutement de nouvelles ouvrières qui défendront le nid à leur tour (Breed *et al.*, 2004). Free (1987) énumère 25 substances, que l'on trouve dans la glande à venin, impliquées dans la réaction d'alarme pour défendre la colonie. Mais il existe quatre phéromones d'alarme principales: l'isopentyl 5 acetate (IPA) (Boch *et al.*, 1962), le cis-11-Eicosenol (Pickett *et al.*, 1982) retrouvées dans la glande à venin, le 2-heptanone qui est produit par les glandes mandibulaires (Shearer, Boch, 1965) et plus récemment le 3-methyl-2-buten-1-yl acetate produit uniquement dans les glandes à venin des abeilles africanisées (Hunt *et al.*, 2003).

Le cis-11-Eicosenol influe sur le recrutement d'abeilles pour aller piquer la cible. Sa faible volatilité suggère que cette molécule aide les abeilles dans le ciblage des piqûres (Pickett *et al.*, 1982). La principale molécule d'alarme, l'IPA suscite une réaction similaire à celle de l'ensemble du mélange phéromonal (Boch *et al.*, 1962). Cette phéromone provoque rapidement un comportement défensif (alerte, recrutement), mais aussi des effets à plus long terme. Des colonies perturbées par du IPA ont leurs réponses défensives qui augmentent en réponse à plusieurs perturbations (Alaux, Robinson, 2007).

B- Orientation

a- Phéromone de Nasonov

Le phénomène de cohésion d'un essaim d'abeilles est dû à un bouquet phéromonal de sept composés (geraniol, nerol, (E,E)-farnesol, (E)-citral, (Z)-Citral, Acide Geranique, Acide Nerolique) produits par la glande de Nasonov des ouvrières, et qui compose donc la phéromone de Nasonov (Free, 1987; Williams *et al.*, 1982). Le signal est libéré à l'extrémité de la face dorsale de l'abdomen des ouvrières pour attirer les ouvrières sœurs de façon organisée et calme (Free, 1987; Winston, 1987). Cette phéromone volatile est produite lors d'une position particulière de l'abeille, qui ventile la phéromone avec ses ailes pour orienter les autres abeilles de la colonie comme par exemple à l'entrée de la ruche (Sladen, 1901) ou pendant l'essaimage (Morse, Boch, 1971). Cette phéromone permet également de trouver une source d'eau ou de nourriture (Winston, 1987).

b- Phéromone de recrutement

Les butineuses exécutent la danse frétilante (ou danse en huit) dans la colonie afin de recruter d'autres ouvrières pour butiner une source rentable de nourriture (Frisch, 1967). En suivant de près une abeille qui danse, les recrues potentielles obtiennent des informations sur l'emplacement et la richesse de la source de nourriture annoncée par la recruteuse (Dyer, 2003; Frisch, 1967). En plus, les abeilles qui dansent émettent 4 hydrocarbures : le Z (9)-tricosène, le tricosane, le Z-(9)-pentacosène et le pentacosane qui sont impliqués dans le comportement actif de recrutement de nouvelles butineuses (Thom *et al.*, 2007). Cette odeur, émise par la cuticule des abeilles est produite en quantité pendant la danse frétilante. Cette phéromone est classée comme une phéromone non glandulaire.

C- Reconnaissance spécifique

Les hydrocarbures cuticulaires (CHC) sont présents sur le corps des ouvrières, des mâles et de la reine. Leur rôle principal est de protéger les insectes de la dessiccation, ils forment une enveloppe imperméable à l'eau sur la cuticule des insectes. Mais les CHC ont aussi évolué comme un moyen de communication entre individus (Blomquist, Bagnères, 2010). La grande diversité des CHC chez les insectes sociaux donne de nombreuses informations comme la reconnaissance des apparentés, la reconnaissance de la tâche accomplie par l'individu, la caste (Le Conte, Hefetz, 2008). Après des travaux controversés, il a été montré que les abeilles domestiques distinguent les différents CHC (Chaline *et al.*, 2005) et ces CHC servent notamment à la reconnaissance des apparentés (Dani *et al.*, 2005). Par exemple, ils indiquent aux gardiennes si la butineuse qui revient à la ruche appartient ou non à la colonie (Dani *et al.*, 2005).

La glande de Dufour de la reine et des ouvrières produit également des sécrétions d'esters et d'hydrocarbures spécifiques en fonction de la caste de l'individu et apparaît comme un signal de fertilité (Katzav-Gozansky *et al.*, 2002b; Katzav-Gozansky *et al.*, 2001; Katzav-Gozansky *et al.*, 1997). Les ouvrières produisent des longues chaînes d'hydrocarbures alors que les reines produisent ces hydrocarbures mais aussi une série unique d'esters. Cette production d'esters est corrélée avec le développement ovarien et apparaît aussi chez les ouvrières reproductrices mais leur quantité reste plus faible que chez la reine (Katzav-Gozansky *et al.*, 2004).

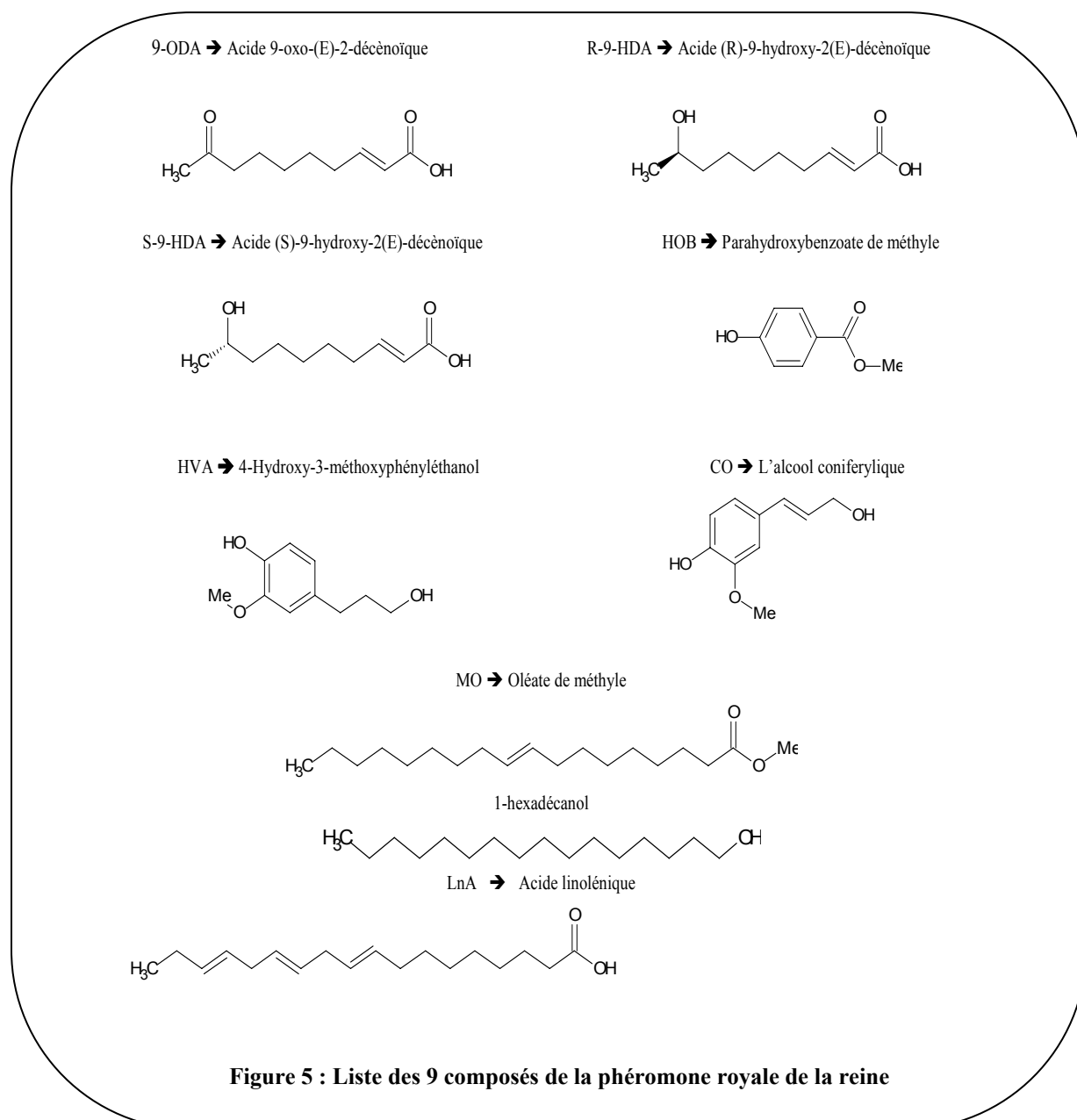
D- Cohésion du nid par la reine

La reine diffuse une information centrale pour réguler l'homéostasie et le développement de la colonie notamment par l'utilisation de phéromones royales. La première phéromone identifiée chez l'abeille domestique, et notamment chez la reine, est un acide : le 9-ODA ((E)-9-oxodec-2-enoic acid) (Barbier, Lederer, 1960; Butler *et al.*, 1962; Pain, 1961). Cette phéromone, identifiée il y a tout juste 50 ans, possède des rôles fonctionnels dans la colonie comme l'attraction des mâles (Gary, 1961b; Gary, 1962), l'attraction des ouvrières dans le comportement de cour à la reine (Slessor *et al.*, 1988), et la castration chimique des ouvrières (Butler *et al.*, 1962). Plus tard, Slessor et al (1988) découvrirent une action synergique de 4 composés au 9-ODA pour le phénomène de cour. Cette phéromone produite par les glandes mandibulaires (QMP = Queen Mandibular Pheromone) est composée de 5 molécules (les deux énantiomères (R+S) du 9-hydroxydec-2-enoic acid (9-HDA), le methyl p-hydroxybenzoate (HOB), 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol (HVA), et le 9-ODA) (Fig. 5).

La QMP attire fortement les jeunes ouvrières et stimule le soin à la reine de la part des ouvrières qui la nourrissent, la nettoient et l'antennent. Ces jeunes ouvrières interagissent avec les autres abeilles du nid et dispersent la QMP dans toute la colonie (Naumann, 1991; Naumann *et al.*, 1993) indiquant la présence et l'influence de la reine. Additionnellement, quatre composés (l'alcool coniféryle, l'oléate de méthyle, l'hexadecan-1-ol et l'acide linolénique) (Fig. 8) agissent synergiquement avec la QMP pour former la QRP (QRP = Queen Retinue Pheromone) dans le phénomène de cour induisant une attraction plus forte des ouvrières vers la reine (Keeling *et al.*, 2003), notamment chez les abeilles qui ne répondent que peu à la QMP (Pankiw *et al.*, 1994; Pankiw *et al.*, 1995).

La QMP a un rôle dans l'architecture du nid : elle favorise la construction de cellules au format ouvrier (en opposition aux cellules de mâles qui sont de diamètre supérieur) (Ledoux *et al.*, 2001), la QMP inhibe la construction de cellules de mâles et de reines jusqu'à un certain stade de développement de la colonie, entraînant une moins bonne circulation de la QMP dans la colonie (Winston *et al.*, 1991; Winston *et al.*, 1990). La QMP engendre la cohésion de l'essaim lors de l'essaimage (Winston *et al.*, 1989).

La QMP est l'une des phéromones les plus étudiées. Récemment, il a été mis en évidence que des traitements à la QMP engendrent une résistance accrue à la privation de nourriture chez les jeunes ouvrières (Fischer, Grozinger, 2008). La QMP affecte l'apprentissage olfactif et la mémoire (Vergoz *et al.*, 2007), modifie l'expression des gènes (Grozinger *et al.*, 2003) et les taux hormonaux (Pankiw *et al.*, 1998a) des abeilles.



E- Entretien du couvain

Dans la colonie d'abeilles, les ouvrières s'occupent des immatures pour assurer le renouvellement de la colonie. Les immatures sont complètement dépendants de l'apport en soins des nourrices, sans nourrice le couvain dépérit. Les larves indiquent donc leurs besoins aux ouvrières pour optimiser leur développement.

Les larves produisent un système phéromonal complexe pour ajuster le comportement et la physiologie des ouvrières à leurs besoins (Free, Winder, 1983; Huang, Otis, 1991; Koeniger, Abelsfelder, 1985; Slessor *et al.*, 2005a). Différentes phéromones du couvain ont été identifiées avec des actions modificatrices et incitatrices sur les ouvrières.

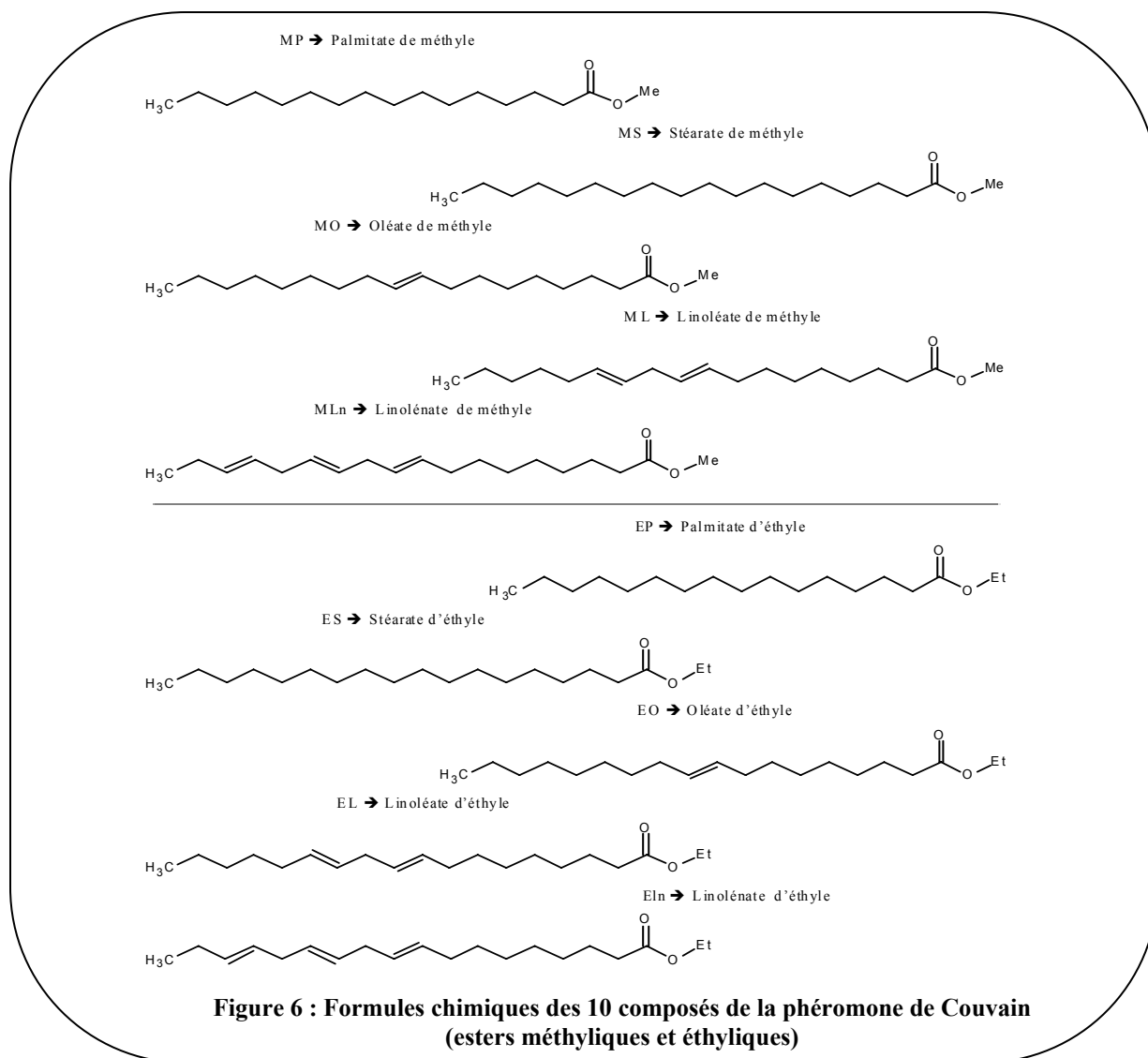
La première phéromone de couvain identifiée est le Glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate (Koeniger, Veith, 1983a; Koeniger, Veith, 1983b). Cette phéromone permet de regrouper une grappe d'ouvrières autour d'une cellule royale. Cette phéromone est retrouvée chez les larves d'ouvrières (2.5µg), de mâles (10µg), et de reines (30µg). Il est possible qu'elle agisse sur la reconnaissance du type de larve par les ouvrières.

Le couvain produit également une autre phéromone composée d'un mélange de 10 esters éthyliques et méthyliques agissant sur la physiologie et le comportement des ouvrières : la BEP (BEP = Brood Ester Pheromone, Pheromone du couvain composée d'ester) (Le Conte *et al.*, 1990) (Fig. 6).

Par l'émission de la BEP, le couvain module le comportement des ouvrières pour améliorer sa nutrition. La BEP induit une augmentation de quantité de gelée royale déposée dans les cellules par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1995a) et modifie la physiologie des ouvrières en augmentant le taux des protéines des glandes hypopharyngiennes des ouvrières (lieu de production d'une partie de la nourriture larvaire) (Mohammedi *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2010). De plus, par l'émission de cette phéromone les larves modulent le butinage du pollen de la colonie (Pankiw, 2007; Pankiw *et al.*, 1998b).

Cette phéromone induit la reconnaissance de l'âge des larves par les abeilles nourrices (Le Conte *et al.*, 1994) et, à la fin du cinquième stade larvaire, une certaine proportion des composés de la BEP induit l'operculation des cellules par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1990).

La BEP, par ces actions, engage les ouvrières vers un soin actif du couvain et à allouer de l'énergie vers le couvain plutôt que dans d'autres tâches.



F- Division du travail

Il existe au moins deux types de divisions du travail dans la société d'abeilles *Apis mellifera* qui sont centrales pour l'organisation de la colonie.

La première division du travail se situe au niveau de la reproduction (Wilson, 1971). Elle est caractérisée par des individus reproducteurs (la reine et les mâles) pour la pérennisation de la colonie et des ouvrières stériles qui s'occupent de toutes les autres tâches de la colonie. Chez les abeilles domestiques, même si certaines ouvrières peuvent pondre des œufs haploïdes non fécondés qui donneront des mâles, la reine produit la quasi-totalité des œufs mâles (œufs non fécondés) et femelles (œufs fécondés).

Chez les espèces hautement eusociales, un deuxième type de répartition des tâches existe entre les ouvrières, qui sont organisées autour d'une division de l'ensemble des travaux nécessaires

au développement de la colonie (Rosch, 1925; Seeley, 1982; Wilson, 1971). Cette division des tâches entre les ouvrières est liée à l'âge. Les ouvrières participent aux tâches à l'intérieur du nid quand elles sont jeunes puis s'engagent dans les activités extérieures quand elles vieillissent. Cette maturation du comportement ou développement comportemental des ouvrières est plus connu sous le nom «polyéthisme d'âge».

a- Division du travail au niveau de la reproduction

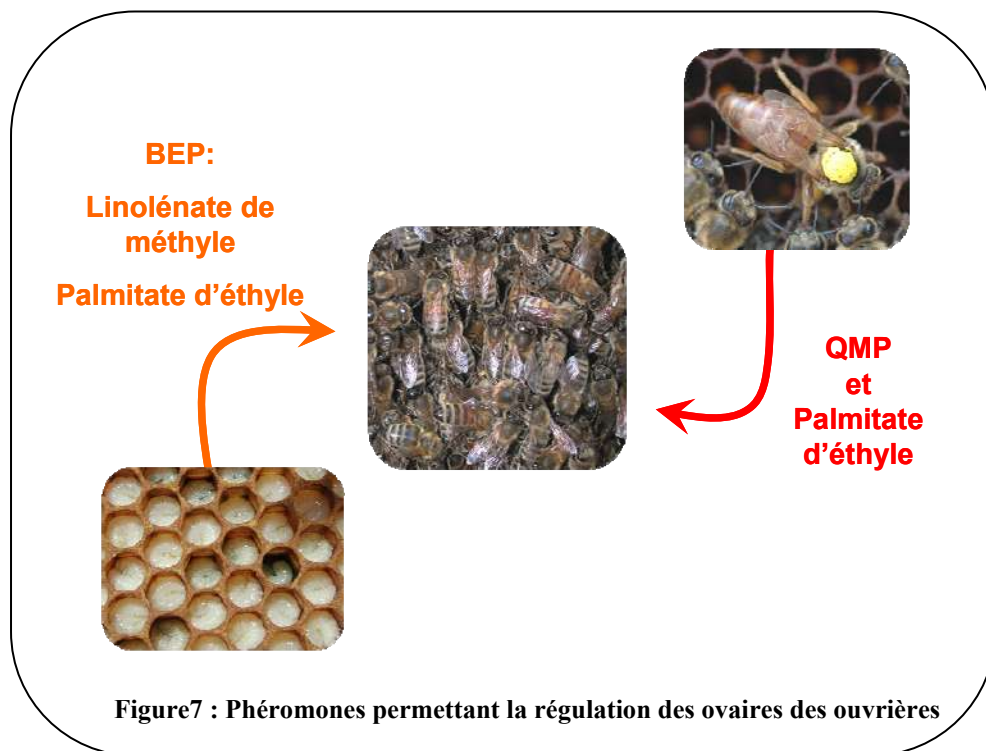
Chez les abeilles, la reine monopolise la reproduction et les ouvrières semi-stériles contribuent à la force de travail de la colonie. Bien que les ouvrières ne soient pas capables de se faire féconder, elles ont la capacité d'activer et de développer leurs ovaires pour pondre des œufs mâles haploïdes (les femelles proviennent d'œufs fécondés et sont diploïdes) (Winston, 1987). Cependant, seulement 7% des mâles élevés dans la colonie proviennent de 0.01% d'ouvrières qui ont leurs ovaires complètement développés (Visscher, 1996).

De nombreuses études montrent que les phéromones modificatrices sont utilisées dans la régulation de la reproduction (Le Conte, Hefetz, 2008). Elles sont utilisées dans des colonies peuplées où la reine est incapable physiquement d'être en contact avec toutes les ouvrières pour réguler leur reproduction. La reproduction des ouvrières est inhibée par la présence de la reine mais également par le couvain (Jay, 1968; Kropacova, Haslbachova, 1969; Kropacova, Haslbachova, 1971). Par exemple, la perte de la reine ou du couvain dans la colonie entraîne l'activation des ovaires de nombreuses ouvrières (environ 10%) (Winston, 1987).

Après des travaux controversés sur la QMP (Willis *et al.*, 1990), il a été établi qu'elle inhibe partiellement les ovaires des ouvrières (Hoover *et al.*, 2003), ce qui permet à la reine de maintenir son statut de reproductrice unique (Fig. 7). Cette phéromone, qui est rapidement dispersée par les ouvrières à travers toute la colonie par le phénomène de cour (Naumann *et al.*, 1991; Winston *et al.*, 1990), oriente également la construction de cire au format des cellules ouvrières (Ledoux *et al.*, 2001). La construction au format ouvrière favorise la ponte d'œufs d'ouvrières par la reine, les mâles étant pondus dans des cellules plus larges.

Le couvain émet la BEP, et plus particulièrement deux esters qui la composent l'éthyle palmitate et le méthyle linolenate (Arnold *et al.*, 1994; Mohammadi *et al.*, 1998; Pankiw, Garza, 2007), qui inhibent l'activation des ovaires des ouvrières (Fig. 7). De plus, l'éthyl

palmitate n'est pas un composé spécifique du couvain puisqu'il est aussi produit par la reine (Keeling, Slessor, 2005). Ces différents composés n'inhibent que partiellement le développement ovarien des ouvrières, et pour l'instant, les effets synergiques et additifs de ces composés ne sont pas démontrés (Hoover *et al.*, 2005b).



Au niveau social

L'inhibition du développement ovarien des ouvrières par les phéromones modificatrices est essentielle pour la stabilité du nid. Une reproduction excessive des ouvrières est défavorable pour la colonie, car elle diminue l'énergie allouée par les ouvrières au couvain et induit donc une baisse des soins au couvain de la colonie (Le Conte, Hefetz, 2008). Un taux excessif d'ouvrières reproductrices réduit également la force de travail de la colonie, car les ouvrières reproductrices travaillent moins, ou pas, en comparaison à des ouvrières stériles (Butler, Fairey, 1963; Dampney *et al.*, 2004).

Le contrôle de la reproduction par les phéromones permet à la société d'abeilles d'avoir des conditions optimales à son développement, tous les individus dirigent leurs efforts à la croissance de la colonie.

La nécessité du contrôle de la reproduction peut être mieux compris quand le système s'effondre ou se déstabilise (reproduction excessive) (Alaux *et al.*, 2010b). C'est le cas des colonies appelées « colonies anarchiques », ces colonies ont été identifiées en Australie (Oldroyd *et al.*, 1994). Elles comportent une grande part d'ouvrières qui activent leurs ovaires et pondent des œufs de mâles malgré la présence de la reine et du couvain (Oldroyd *et al.*, 1999). Le contrôle phéromonal est peut être inefficace ou moins puissant, car ces colonies ont des reines qui produisent des taux normaux de QMP (Hoover *et al.*, 2005a). Les ouvrières seraient donc moins sensibles aux QMP, ou la transmission et la réception de la QMP pourraient être moins efficaces dans la colonie (Hoover *et al.*, 2005b). Ces colonies semblent également avoir une sensibilité moindre à la BEP en comparaison à des colonies « normales » (Oldroyd *et al.*, 2001).

Autre exemple, il existe une race invasive, parasite d'abeilles : les abeilles *Apis mellifera capensis* (l'abeille du cap), qui se reproduisent de manière incontrôlée dans des ruches d'*Apis mellifera scutellata* (Martin *et al.*, 2002). Dans les ruches hôtes, les ouvrières pondent des œufs viables qui donnent des clones d'elles-mêmes (reproduction par parthénogenèse thelytoque). En quelques semaines, les ruches scutellata infectées par les ouvrières du cap dépérissent, le nombre d'ouvrières parasites augmente, ce qui entraîne une diminution du butinage et de la quantité de nourriture disponible dans la colonie, les abeilles parasites travaillant moins (Martin *et al.*, 2002). La capacité des abeilles du cap à développer leurs ovaires dans les colonies hôtes suggère que ces abeilles arrivent à dépasser les barrières mises en place par la ruche pour inhiber la reproduction, notamment les barrières chimiques. Les abeilles parasites sont capables de produire certains composés de la QMP (Simon *et al.*, 2001). En regardant le profil chimique de ces abeilles parasites, elles apparaissent comme des pseudo reines et ne sont pas chimiquement castrées par les composés qu'elles produisent (Dietemann *et al.*, 2007; Dietemann *et al.*, 2006).

Ces exemples montrent que la sélection au niveau de la colonie peut dépasser la sélection individuelle. L'augmentation du nombre d'individus reproducteurs engendre une déstabilisation de la cohésion du nid. La reproduction des ouvrières peut être vue comme un cancer de la colonie, assimilé à un cancer social où les individus reproducteurs « parasites » sont des cellules cancéreuses qui se propagent dans la colonie et la fragilisent (Alaux *et al.*, 2010b; Amdam, Seehuus, 2006).

b- Division du travail entre les ouvrières

Le polyéthisme lié à l'âge

Les ouvrières peuvent effectuer virtuellement toutes les tâches de la colonie entre l'émergence et leur mort. Mais paradoxalement elles passent une majorité de leur temps immobiles où à marcher dans le nid sans tâche apparente. Ces périodes d'inactivité sont entrecoupées par des sessions d'activité pendant lesquelles les ouvrières travaillent à différentes tâches spécialisées (Winston, 1987). L'essentiel du polyéthisme d'âge d'une ouvrière est résumé dans la figure 8. Pour plus de lisibilité chez les abeilles où la division du travail est très présente, le mot caste permet de différencier les individus travaillant à la même tâche. Ce polyéthisme d'âge ou développement comportemental révèle 4 grandes classes distinctes qui se chevauchent.

Chronologiquement :

Les nettoyeuses de cellules

Ces abeilles émergentes (0-3 jours) ne peuvent pas voler ou piquer et sont considérées comme immatures (Calderone, 1998; Winston, 1987). Les premiers jours de leur vie, les abeilles finissent leur maturation. Ces jeunes abeilles travaillent au nettoyage des cellules, et le reste du temps sont inactives ou se toilettent (Seeley, 1982). Ce groupe n'est pas une composante essentielle au fonctionnement de la colonie, d'autres individus, d'autres castes nettoient les cellules.

Les nourrices

Les nourrices prennent soin du couvain en le nourrissant avec une sécrétion riche en protéines, produite par deux de leurs glandes (mandibulaire et hypopharyngienne), qui permet la croissance des larves, qui n'ont pas à digérer le pollen (la cuticule du pollen est indigeste). Le stade de nourrice dure environ de l'âge de 4 à 12 jours (Ribbands, 1953; Seeley, 1982). Cette caste nourrit également les abeilles émergentes et est, par conséquent, essentielle pour le développement et le passage de l'abeille du stade larvaire au stade adulte (Crailsheim *et al.*, 1992). Les nourrices prennent également soin de la reine en lui prodiguant les soins nécessaires à sa survie.

Les abeilles d'âge intermédiaire (MAB Middle-Aged Bees).

Les MAB s'occupent de tâches à l'intérieur du nid de l'âge de 12 à 21 jours en moyenne (Johnson, 2008b; Seeley, 1982). Bien que leur distribution chevauche celle des nourrices, leur comportement est tout à fait distinct, car elles ne montrent aucun intérêt à l'entretien du couvain (Johnson, 2008b). Les MAB participent à environ 15 tâches, allant de la construction du nid et son entretien, en passant par la réception du nectar et son traitement, à la défense du nid (Johnson, 2003; Johnson, 2008a; Johnson, 2008b; Seeley, 1982; Trumbo *et al.*, 1997). Les jeunes MAB semblent passer plus de temps à l'entretien de la colonie en général, tandis que les MAB plus âgées s'occupent de tâches plus près de l'entrée du nid (réception du nectar) (Seeley, 1995; Trumbo *et al.*, 1997).

Les butineuses.

Une fois la transition vers le butinage effectuée, les abeilles ne s'occupent plus des tâches d'intérieur (Seeley, 1995; Winston, 1987) mais de la recherche de ressources dont la colonie a besoin (propolis, eau, pollen et nectar). La majorité du butinage est orientée vers la récolte du pollen et du nectar, sauf dans les périodes de stress thermique pendant lesquelles la collecte d'eau peut être intensive (Seeley, 1995). Bien que des preuves d'abeilles spécialisées dans la récolte du pollen ou du nectar aient été établies (Ament *et al.*, 2010; Beshers, Fewell, 2001; Calderone, Page, 1992; Page, Robinson, 1991), la plupart des butineuses se spécialisent sur un vol de butinage (Seeley, 1985; Seeley, 1995). Au cours de leur vie de butineuse, la majorité des abeilles semble être généraliste pouvant récolter du nectar, du pollen ou les deux (Seeley, 1995).

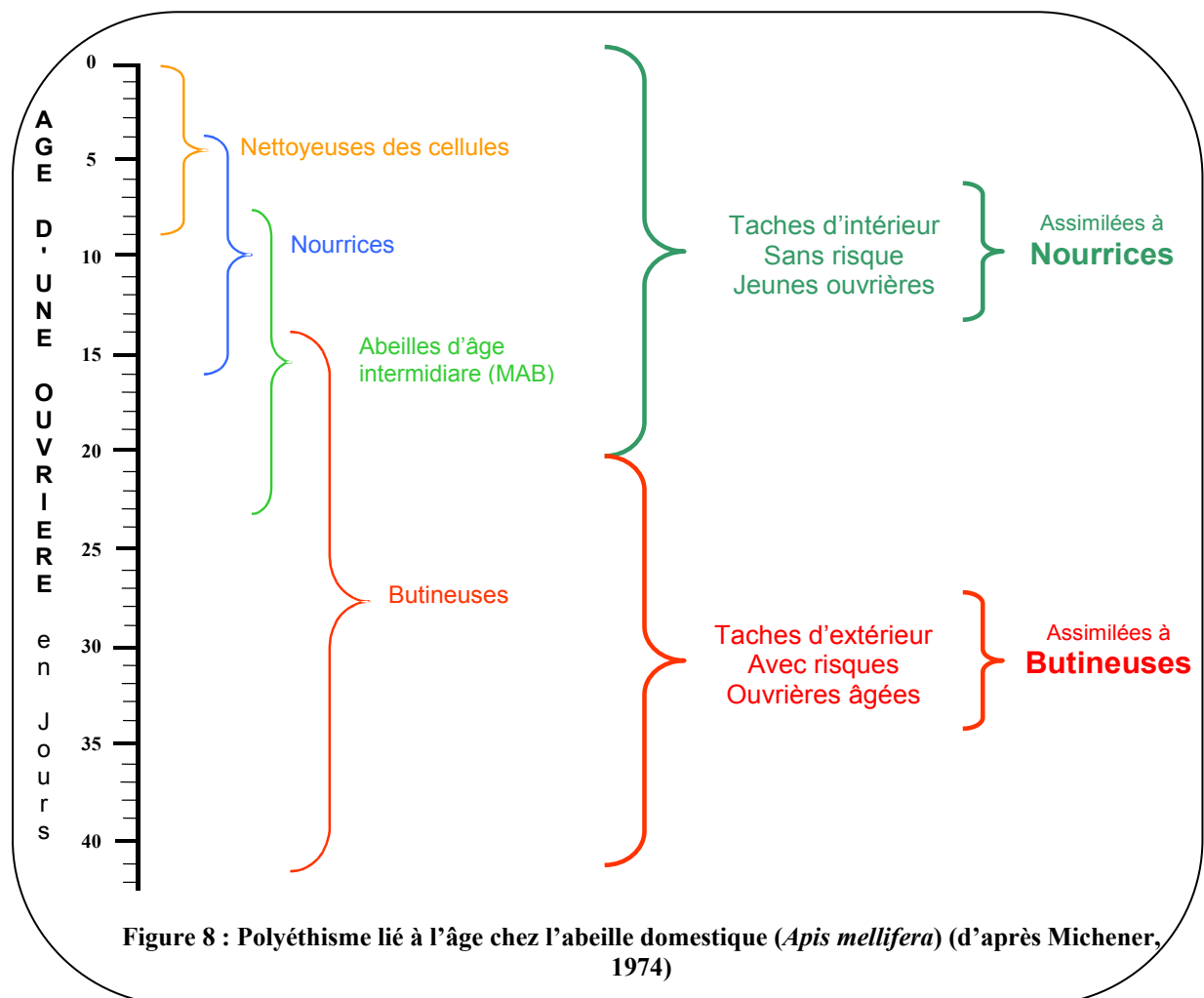
Flexibilité : une clé dans la réussite de ces sociétés

Les étapes de la maturation comportementale d'une ouvrière sont similaires pour chaque abeille, par contre le temps qu'elles consacrent à chaque tâche est plastique (Winston, 1987). Dans la colonie, les individus présentent une variabilité de développement comportemental très important, les ouvrières passent d'une caste à l'autre à des âges différents. Certaines ouvrières ont une maturation comportementale très rapide et d'autres, au contraire, plutôt lente (Nowogrodzki, 1984). Les ouvrières ajustent leur développement comportemental en réponse aux conditions internes au nid et aux conditions environnementales. Par exemple, lors d'un manque de butineuse dans la ruche, les jeunes abeilles ajustent rapidement leur

maturation comportementale; certains individus commenceront alors à butiner à l'âge de 5 jours, soit 2 semaines plus tôt que la normale et inversement, lors d'une abondance de butineuses dans la colonie, les nourrices ralentissent leur développement comportemental (Huang, Robinson, 1996). Cette flexibilité assure à la colonie un équilibre dans son développement et ses besoins.

Importance du ratio nourrices / butineuses

Le stade nourrice et le stade butineuse sont les deux stades les plus stables et distincts dans la vie d'une abeille (Ament *et al.*, 2010; Robinson, 1992). Dans les conditions normales, une fois la transition de nourrice à butineuse effectuée, l'abeille ne remplit plus que la tâche de butineuse et cesse toute autre activité. Cependant certaines butineuses puissent être contraintes de s'occuper à nouveau du couvain. Ces anciennes butineuses redevenues nourrices, sont moins efficaces dans l'élevage du couvain, certains aspects de la transition seraient irréversibles (Robinson, 1992).



La transition de nourrice à butineuse suggère que les MAB et les nourrices soient incluses dans la même caste. Le terme « nourrice » est alors égal à « abeille s'occupant des tâches d'intérieur du nid dites sans risque » à l'inverse de « butineuse » qui indique « abeille effectuant des tâches d'extérieur à risques » (Fig. 8).

Le rapport nourrices / butineuses est très étudié (Robinson, 1992), car il est très important pour la colonie. Un manque de butineuses engendrera une baisse de nourriture pour la colonie et à l'inverse, un nombre insuffisant de nourrices produira une baisse des soins apportés au couvain. Ce ratio doit donc être optimum pour le développement de la colonie.

Cette transition du stade nourrice vers le stade butineuse engendre des changements hormonaux associés à des changements nutritionnels, génétiques et physiologiques chez l'abeille.

Mécanismes associés à la maturation comportementale

La physiologie

Chez les ouvrières, le développement et la résorption de plusieurs glandes sont en lien direct avec le travail effectué par une abeille et par la transition nourrice / butineuse. Les glandes mandibulaires, hypopharyngiennes et cirières sont très développées chez les nourrices puis leur taille diminue et elles se résorbent au moment du passage au stade butineuse (Winston, 1987). Ces glandes produisent les éléments nécessaires à la nutrition du couvain (bouillie larvaire, gelée royale) et à l'entretien et la construction du nid (cire). Paradoxalement, certaines de ces glandes ne sont pas inactives lorsqu'elles sont réduites, chez les butineuses, les HPG produisent de l'invertase pour le butinage du nectar (Simpson *et al.*, 1968).

D'autres changements accompagnent le développement comportemental des abeilles, comme la perte de 40% du poids des abeilles lors de leur transition vers le butinage. Au stade butineuse, les abeilles augmentent leurs taux de consommation d'oxygène dans le thorax et de glycogène dans les tissus associés. Ces changements physiologiques permettent d'optimiser le butinage en diminuant les coûts associés (Winston, 1987).

De plus, une abeille perd la moitié de ses réserves lipidiques abdominales lors du passage de nourrice à butineuse. La perte des lipides est stable, la quantité des lipides des butineuses reste basse, même lorsque la nourriture est abondante (Toth *et al.*, 2005; Toth, Robinson, 2005).

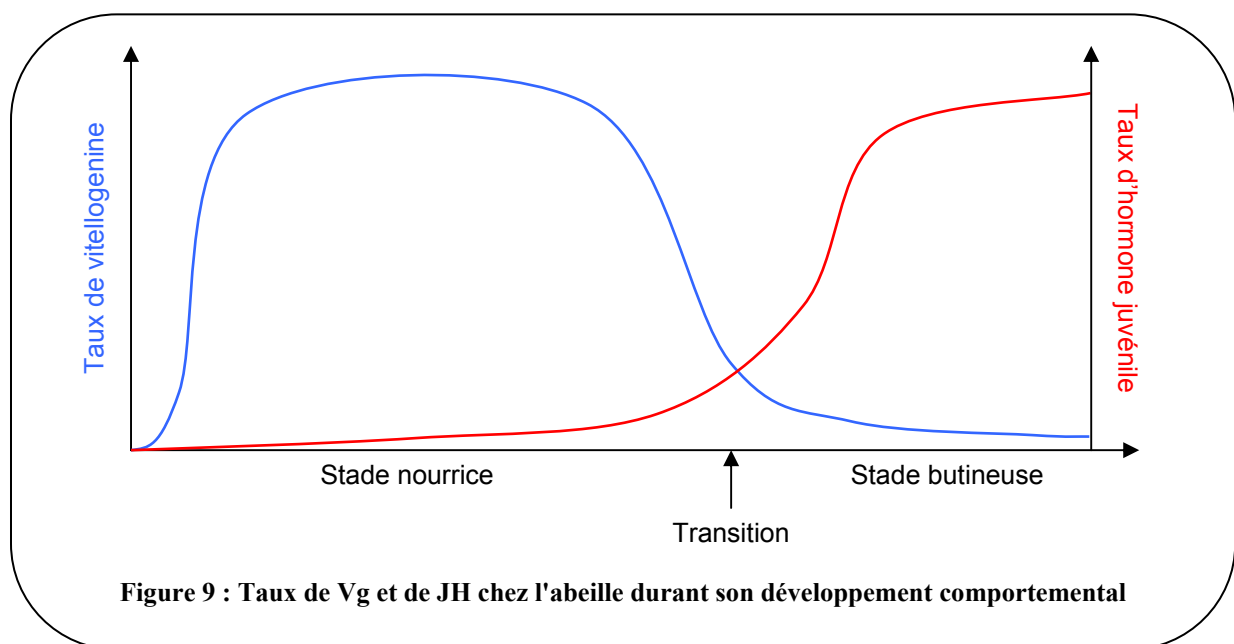
Egalement, des abeilles se trouvant dans des colonies affamées commencent à butiner plus tôt que des abeilles dans des colonies avec de la nourriture en quantité suffisante. La disponibilité

de la nourriture à l'intérieur de la ruche est donc un facteur jouant sur le développement comportemental des abeilles. La nutrition de la colonie engendre un changement comportemental des individus, la part de la nourriture ingérée par l'individu influence sa maturation comportementale plutôt que la présence de nourriture dans la ruche (Schulz *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2002).

La disponibilité en nourriture pour chaque individu dans la colonie conduit à des changements dans leur capacité à stocker des éléments nutritifs à l'intérieur de leur corps, et engendre des changements dans leur physiologie et leur développement comportemental (Ament *et al.*, 2010).

Les hormones

La maturation comportementale des abeilles est liée à plusieurs hormones. De nombreuses études ont montré une corrélation entre l'augmentation du taux de l'hormone juvénile (JH = Juvenile Hormone) et l'âge au premier butinage des abeilles (Huang, Robinson, 1992; Rachinsky, Hartfelder, 1990; Robinson, 1987). Le taux d'hormone juvénile augmente avec l'âge des abeilles, mais également avec le développement comportemental des abeilles, les butineuses ont des taux plus élevés de JH dans leur hémolymphe que les nourrices. Un traitement des abeilles avec du methoprène (un analogue de la JH) engendre un butinage précoce des abeilles (Robinson, 1987). La JH est produite dans les *corpora allata*, une paire de glandes sécrétrices localisées à proximité du cerveau, une ablation de ces glandes engendre un retard de la maturation des abeilles (Sullivan *et al.*, 2000).



Plus récemment, la vitellogenine (Vg), une hormone produite dans les corps gras des abeilles, a été identifiée comme inhibant la maturation des abeilles (Amdam *et al.*, 2003). Cette hormone sécrétée dans l'hémolymphe comme un précurseur de la vitelline est aussi une protéine de stockage (Fluri *et al.*, 1982). Quand la production de Vg est stoppée par du RNA interférence (RNAi), les abeilles ont une maturation comportementale accélérée (Nelson *et al.*, 2007). Des applications topiques de metoprolène et l'arrêt de l'expression de la Vg par RNAi diminuent le taux de Vg et augmentent celui de la JH. Donc la JH et la Vg semblent interagir chez les abeilles en s'inhibant réciproquement (Page, Amdam, 2007) (Fig. 9).

Une neuro-hormone, l'octopamine, a aussi un rôle dans les mécanismes de transition entre nourrices et butineuses. Cette neuro-hormone se retrouve en plus forte quantité dans le cerveau (Wagener-Hulme *et al.*, 1999), et plus particulièrement dans les lobes antennaires (Schulz, Robinson, 1999) des butineuses, que dans ceux des nourrices. Des traitements à l'octopamine engendrent un butinage précoce des nourrices (Schulz, Robinson, 2001).

La génétique

Dans une colonie, les ouvrières ont une transition de nourrice à butineuse à des âges différents en fonction de leur génotype (Calderone, 1998; Calderone, Page, 1992; Giray, Robinson, 1994; Giray, Robinson, 1996; Kolmes *et al.*, 1989; Page *et al.*, 1995; Robinson, Page, 1989; Winston, Punnett, 1982). Certains génotypes ont un développement comportemental plus rapide que d'autres dans une même colonie.

En outre, les différences raciales interviennent aussi dans la maturation des abeilles. Les deux races *A. m. ligustica* et *A. m. mellifera*, qui sont les plus éloignées génétiquement (Whitfield *et al.*, 2006a), ont des maturations comportementales très différentes. Les ouvrières des colonies d'*A. m. ligustica* ont un développement comportemental rapide alors que les abeilles des colonies d'*A. m. mellifera* ont une maturation plus longue (Brillet *et al.*, 2002).

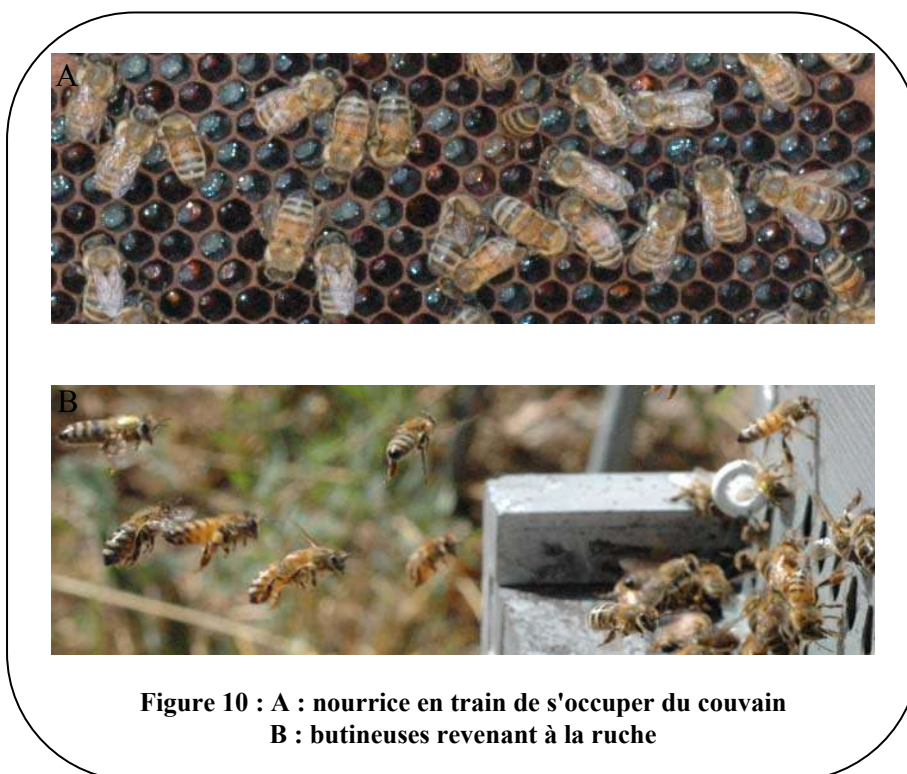
Le polyéthisme d'âge est également associé à des différences dans l'expression de gènes dans le cerveau (Whitfield *et al.*, 2003), dont certaines sont associées à des changements neuronaux, physiologiques ou métaboliques (Whitfield *et al.*, 2006b). Les études génétiques de la transition des nourrices à butineuses commencent à montrer les actions des gènes qui régulent la division du travail (Denison, Raymond-Delpech, 2008). Par exemple les facteurs de transcription, comme ceux identifiés par (Sinha *et al.*, 2006), peuvent sur ou sous réguler de nombreux gènes impliqués dans la maturation des abeilles. Les études de gènes individuels

comme *foraging* (Ben-Shahar *et al.*, 2002), *malvolio* (Ben-Shahar *et al.*, 2004) et *vitellogenin* (Nelson *et al.*, 2007) sont tous impliqués dans la maturation comportementale et peuvent être au centre de la transition de nourrice à butineuse.

La transition du stade nourrice à butineuse s'accompagne donc de ces différents changements. Des stimuli perçus par l'abeille engendreront des modifications comportementales ou physiologiques pour que la colonie ajuste son équilibre butineuses / nourrices. Une part importante de ces signaux est formée par des phéromones émises par les différents individus de la colonie.

Phéromones et division du travail des ouvrières

La transition de nourrice à butineuse (Fig. 10) est contrôlée par différents acteurs de la colonie : la reine, le couvain et les butineuses qui régulent la progression des jeunes abeilles vers des tâches spécifiques aux abeilles âgées.



La reine.

Elle intervient dans ce mécanisme de régulation en émettant la QMP. Cette phéromone modère la vitesse de progression des ouvrières des tâches d'intérieur vers les tâches d'extérieur. La QMP retarde l'âge des abeilles au butinage (Pankiw *et al.*, 1998a), les abeilles

restent donc plus longtemps auprès de la reine, à lui prodiguer des soins. La QMP régule les mécanismes associés à la maturation des ouvrières notamment les hormones et les gènes. La QMP inhibe la production de JH (Kaatz *et al.*, 1992; Pankiw *et al.*, 1998a) et à l'inverse augmente les taux de Vg des ouvrières (Fischer, Grozinger, 2008). La QMP active les gènes corrélés avec le comportement de nourrices et désactive les gènes associés avec le comportement de butinage (Grozinger *et al.*, 2003).

Le couvain.

L'équilibre optimal entre le nombre de nourrices et de butineuses dépend également de l'abondance des aliments et de la quantité de couvain à nourrir. Le couvain régule la répartition des tâches des ouvrières en produisant des phéromones modificatrices. Le couvain émet la BEP qui régule l'âge au butinage des ouvrières. La réponse des ouvrières à la BEP est dose dépendante : à faible dose, la phéromone stimule la maturation comportementale des abeilles et à forte dose retarde l'âge au butinage (Le Conte *et al.*, 2001). Le couvain manipule les ouvrières pour optimiser les soins qu'elles lui procurent. Comme la QMP, la BEP agit sur les mécanismes hormonaux et génétiques impliqués dans cette régulation. La BEP à forte dose inhibe la production de JH des ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001) et de faibles doses de BEP diminuent le taux de Vg des ouvrières (Smedal *et al.*, 2009). Au niveau génétique, la BEP administrée en forte dose aux abeilles induit une sur-expression des gènes associés au stade nourrice et désactive les gènes associés au comportement de butinage chez les jeunes abeilles (Alaux *et al.*, 2009).

Les butineuses.

La colonie d'abeilles a un mécanisme d'autorégulation entre les nourrices et les butineuses particulièrement adapté pour réguler la taille de la colonie (Huang, Robinson, 1992; Huang, Robinson, 1996; Leoncini *et al.*, 2004a). Un manque de butineuses accélère le développement comportemental des abeilles et un manque de nourrices retarde le développement comportemental des ouvrières. Les abeilles âgées (butineuses) inhibent la maturation comportementale des jeunes abeilles par contact (Huang, Robinson, 1992; Leoncini *et al.*, 2004a). L'une des clés de cette autorégulation est une phéromone sociale: l'oléate d'éthyle (EO = Ethyl Oleate) produit par les butineuses (Leoncini *et al.*, 2004b). L'EO ralentit la progression naturelle des ouvrières vers le stade butineuse (Leoncini *et al.*, 2004b).

L'EO, est aussi produit par la reine (Keeling, Slessor, 2005) et le couvain (Le Conte *et al.*, 1989), ce qui en fait une phéromone coloniale (phéromone produite par différents acteurs de la colonie) (Slessor *et al.*, 2005a) inhibant la maturation comportementale des ouvrières.

Au niveau social

Un élément clé du développement des colonies d'insectes sociaux est la sensibilité et la capacité de la société de réaffecter des ouvrières à certaines tâches, en réponse à l'évolution et aux changements des conditions internes et externes au nid (Robinson, 1992). Cette spécificité est remarquable chez les abeilles domestiques.

Dans la colonie, un contrôle du travail centralisé est opéré par une seule reine, qui produit une ligne de base phéromonale et plus précisément, un certain niveau de QMP qui retarde le développement comportemental des ouvrières et assure la cohésion du groupe (Winston, Slessor, 1992). Cette phéromone est produite en quantité stable, si cette quantité diminue ou devient mal perçue par les ouvrières, la colonie se reproduit par essaimage ou remplace la vieille reine (Winston *et al.*, 1991).

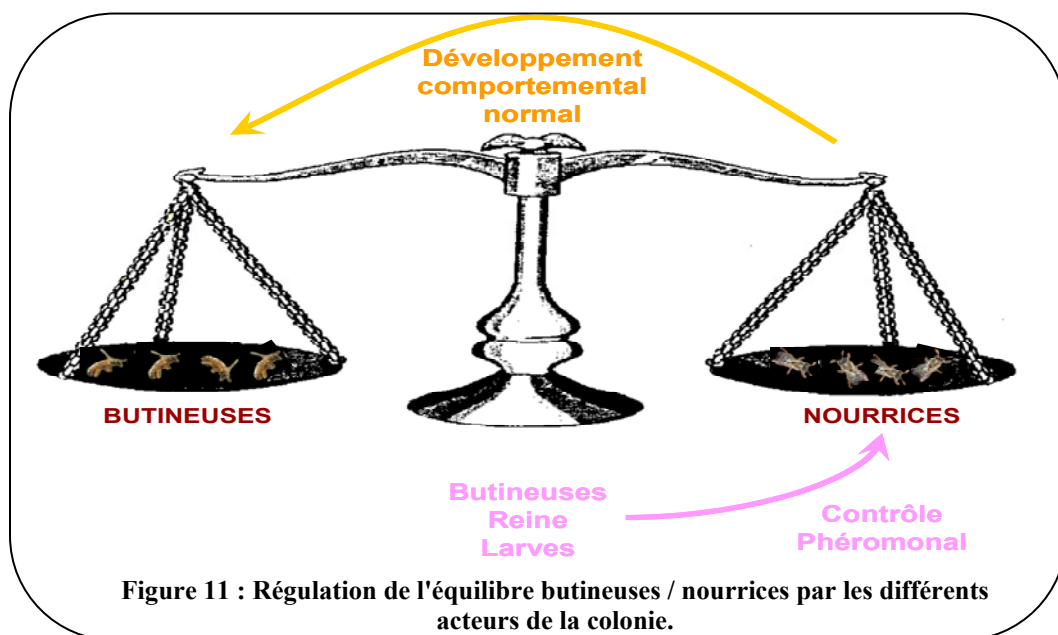
Cependant, la structure de la colonie, ses besoins et les conditions internes et externes au nid changent tout au long de l'année. Ainsi, la régulation de la division des tâches et l'allocation de certaines tâches aux différentes ouvrières sont dynamiques et sont gouvernées par des interactions entre les différents individus de la colonie (auto-organisation).

Le contrôle du ratio nourrices / butineuses s'effectue également par des interactions entre ouvrières. Les butineuses inhibent par contact les jeunes ouvrières dans leur maturation comportementale (Huang, Robinson, 1992; Huang, Robinson, 1996; Leoncini *et al.*, 2004a). Des extraits chimiques des molécules contenues sur les nourrices stimulent la maturation comportementale des jeunes abeilles (Pankiw, 2004b) ; à l'inverse des extraits chimiques de butineuses et la phéromone EO (produite en partie par les butineuses) inhibent le développement comportemental des jeunes abeilles (Leoncini *et al.*, 2004b; Pankiw, 2004b). Ces résultats suggèrent un mécanisme d'autorégulation des butineuses et des nourrices particulièrement adapté à la régulation des besoins de la colonie. Une perte de butineuses due à de la prédation ou à un pesticide pourrait être signalée par une baisse d'EO dans la colonie et donc engendrerait une accélération de la maturation des jeunes abeilles. A l'inverse, la fin d'une floraison engendre un taux de butineuses très important dans la colonie et de ce fait un

taux important d'EO dans la colonie, qui contraint les jeunes abeilles à rester dans le nid plus longtemps avant de devenir butineuses.

Une augmentation de la surface de couvain dans la colonie, donc une augmentation des soins à apporter au couvain, est perçue par les ouvrières par l'émission de la BEP par le couvain, de fortes doses de BEP induisant un allongement du stade nourrices chez les ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001), avec un développement des HPG plus important (Mohammedi *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2010). A l'inverse, une baisse de la surface de couvain, induit une diminution des besoins en nourrices et suggère que la colonie a besoin de plus de nourriture pour augmenter la ponte de la reine et l'élevage du couvain ; ce besoin est aussi communiqué par la BEP qui, à faible dose, accélère le développement comportemental des abeilles et donc le butinage (Le Conte *et al.*, 2001). La BEP permet également une augmentation rapide du butinage de pollen chez des abeilles déjà butineuses (Pankiw, 2004a; Pankiw, 2007). Grâce à l'émission de la BEP par le couvain, la colonie ajuste sa force de travail en réponse aux besoins du couvain (rétrocontrôle).

Dans la colonie, les individus coordonnent leurs tâches et leurs actions à travers différentes phéromones : QMP, BEP et EO qui interviennent au travers de mécanismes de régulation, respectivement, un contrôle central, une autorégulation et un rétrocontrôle (Fig. 11)



Problématique et objectifs de l'étude

Problématique et objectifs de l'étude

Les mécanismes phéromonaux ont un rôle majeur dans la régulation des tâches dans la colonie d'abeilles, en particulier dans la division de la reproduction et la division du travail entre les ouvrières. Le système de communication phéromonal est bien documenté chez l'abeille mais de nombreuses recherches restent à entreprendre pour déchiffrer ce langage particulier.

Le rôle des **butineuses** est essentiel dans la régulation des tâches des ouvrières, une carence en butineuses induit une accélération de la maturation des nourrices, à l'inverse, un excès de butineuses provoque un retard de l'âge au premier butinage des nourrices. L'identification de la phéromone des butineuses : l'**EO**, responsable du ralentissement du développement comportemental des nourrices, par le laboratoire, est une découverte majeure dans la compréhension de la régulation de l'équilibre butineuses / nourrices dans la colonie.

Mais de nombreuses questions restent en suspend sur l'activité de cette molécule dans la colonie : biosynthèse, sources, transfert, réception, dégradation, effet seuil...

La publication de la découverte de cette phéromone inhibitrice dans la revue PNAS a incité la création d'un projet pour répondre à ces questions. Quatre laboratoires se sont regroupés et concertés (Erika Plettner, Simon Fraser University, Canada ; Wolfgang Rössler, Wuerzburg University, Allemagne ; Watmough James, University of New Brunswick, Canada ; Yves Le Conte, INRA Avignon, France) et ont obtenu un financement dans le cadre de HFSP (Human Frontier Science Program).

Le projet Human Frontier Science propose d'étudier les traits de vie de l'EO dans la colonie, du niveau moléculaire au niveau de la colonie et en particulier :

- La biosynthèse et la dégradation de l'EO, avec les aspects moléculaires et cellulaires du turnover de l'EO.
- La perception de l'EO au niveau individuel et son impact sur la physiologie sensorielle des abeilles (changements neuronaux et synaptiques).
- La circulation et le transfert de l'EO dans la colonie.
- Les variations de production de l'EO en fonction de la génétique et de l'environnement de la colonie.

- Les seuils de réponse des colonies aux variations de production d'EO.
- La modélisation des résultats obtenus pour essayer de créer des modèles mathématiques sur la division du travail sous l'influence de l'EO.

Dans le contexte de ce projet, le travail présenté dans cette thèse vise à répondre aux questions suivantes :

- Où est produit l'EO chez les butineuses ?
- Comment est-il transmis des butineuses vers les nourrices ?
- Existe-t-il des variations génétiques dans la production de l'EO selon la race des abeilles ?
- La demande en butineuses varie en fonction de l'environnement. La production de l'EO varie-elle pour ajuster le nombre de butineuses en fonction de la saison ?
- Des stress environnementaux (pesticides, parasites...) peuvent-ils modifier la production de cette molécule dans la colonie et déstabiliser son organisation ?
- Comment la colonie d'abeilles s'adapte-t-elle aux variations de l'EO. Existe-t-il un effet dose-réponse de l'EO dans la colonie ?

Pour répondre à ces questions, nous proposons deux articles publiés. Le premier décrit l'étude de la dynamique de l'EO dans la colonie : sa transmission des butineuses vers les nourrices et sa production, en fonction de la saison de butinage et de la race de la colonie. Le second article traite de l'impact de facteurs externes, un pesticide et un parasite, sur la production de cette phéromone par les abeilles. La sensibilité des colonies aux variations d'EO sera discutée dans la discussion et des perspectives de recherches seront émises.

Mais parallèlement au projet HFS d'autres questions de recherche sur la communication chimique de la colonie d'abeilles restent posées. Notamment pour la **reine** et le **couvain**, chez qui deux phéromones majeures, respectivement la QMP et la BEP, ont été identifiées. Ainsi, malgré des effets pleiotropiques de ces deux phéromones dans la colonie, existe-t-il d'autres phéromones majeures produites par ces acteurs ?

L'étude de la communication chimique de la reine est un challenge intéressant car le rôle de la QMP est bien décrit mais certaines glandes de la reine semblent aussi avoir un rôle dans sa

communication chimique. Notamment les exsudats de la glande tergale et la glande de Dufour sont impliquées dans plusieurs régulations sociales dans la colonie.

Cette réflexion soulève donc plusieurs questions :

- La QMP est-elle la seule phéromone chez la reine ?
- Quelle est l'importance de la QMP par rapport à d'autres éventuelles phéromones ?
- La glande mandibulaire est-elle le lieu unique de synthèse des différents composés de la QMP chez la reine ?
- Existe-t-il une redondance phéromonale dans le contrôle de la colonie par la reine (plusieurs phéromones induisant le même effet) ?

Pour répondre à ces questions, nous avons utilisé une méthode chirurgicale d'ablation des glandes mandibulaires des reines. Le comportement et la physiologie des ouvrières en présence de ces reines opérées a ensuite été analysé. Les résultats sont décrits dans un troisième article présenté dans cette thèse.

L'étude de la communication chimique du couvain est aussi un challenge attrayant car seuls des composés phéromonaux de faibles volatilités ont été découverts chez cet acteur de la colonie. Bien que peu étudiée, on peut supposer que la transmission de ces phéromones, et notamment la BEP, aux ouvrières se fait par contact, où à faible distance. Les nourrices sont donc les individus les plus exposés à ces phéromones. Mais le couvain a des actions sur l'ensemble de la colonie, sur les nourrices mais aussi sur les autres ouvrières, qui n'apportent plus de soins directs au couvain. Par exemple, le couvain a un effet inhibiteur sur le développement des ovaires de l'ensemble des ouvrières. Notre hypothèse est la suivante : le couvain pourrait émettre des phéromones volatiles qui puissent atteindre toutes les abeilles du nid. L'émission de phéromones volatiles permettrait au couvain de renforcer les effets de la BEP pour indiquer ses besoins à la colonie.

Pour tester cette hypothèse nous avons tenté de répondre à plusieurs questions :

- Le couvain produit-il des composés volatils ?
- Les composés volatils ont-ils des effets sur le comportement ou la physiologie des ouvrières ?
- Ces effets sont-ils similaires aux effets de la BEP ?

- Les larves produisent-elles les mêmes quantités de ces composés en fonction de leur âge ?
- Quels peuvent-être les avantages de composés volatils et de composés moins volatils dans la communication chimique de la colonie d'abeilles ?

Les composés volatils émis par le couvain ont été recherchés, identifiés, quantifiés puis testés en conditions contrôlées sur leur rôle potentiel dans la communication chimique de la colonie. Le premier article décrit l'identification d'une molécule volatile : le E- β -ocimène et la caractérisation de son action sur la régulation de la reproduction des ouvrières. Un second article étudie la production du E- β -ocimène en fonction de l'âge des larves, et la caractérisation de ses effets : sur les nourrices (régulation des glandes hypopharyngienne) en conditions contrôlées et sur toutes les ouvrières (division du travail) en conditions naturelles.

Après avoir approfondi les connaissances de la communication chimique entre le couvain, les ouvrières et la reine, une discussion générale propose une représentation plus complète des mécanismes phéromonaux impliquées dans les régulations au sein de la colonie.

**Chapitre II Caractérisation de la phéromone des butineuses
l'Oléate d'Ethyle : transmission, dynamique et impact du stress
sur sa production.**

Chapitre II Caractérisation de la phéromone des butineuses, l'Oléate d'Ethyle : transmission, dynamique et impact du stress sur sa production.

Avant propos :

La reine, le couvain et les butineuses interviennent dans la maturation comportementale des ouvrières en produisant respectivement la QMP, la BEP, et l'EO. L'EO participe à l'autorégulation de la division du travail par les butineuses pour maintenir un juste ratio nourrices/butineuses dans la colonie.

La régulation des ouvrières par cette phéromone est majeure pour la colonie. Nous avons étudié certains traits de son histoire de vie dans la colonie.

Nous avons tenté de valider l'hypothèse de la transmission de l'EO des butineuses aux nourrices par l'intermédiaire du nectar, du pollen et de la cuticule des butineuses. La quantité d'EO contenue dans ces différents compartiments a été analysée. Puis nous nous sommes intéressés à la dynamique de l'EO dans la colonie en analysant sa production chez les ouvrières à travers la saison de floraison (Mai à septembre) (influence de l'environnement) et chez deux races d'abeilles *Apis mellifera mellifera* et *ligustica* (influence de la race).

Ensuite, nous avons analysé l'effet de stress externes à la colonie sur la production de cette phéromone. Une modification de la production de cette phéromone (augmentation ou diminution) par un stress externe, peut perturber l'équilibre nourrices/butineuses. Le CCD (syndrome d'effondrement des colonies = colony collapse disorder) présente des symptômes bien décrits : un dépeuplement massif des abeilles, présence de couvain et de réserves conséquents, et une reine entourée d'une poignée de jeunes abeilles. Ce dépeuplement massif pourrait être dû à une modification des mécanismes phéromonaux de la colonie d'abeilles. Nous avons travaillé sur l'impact de l'imidaclopride (un pesticide utilisé actuellement en agriculture) et de *Nosema* spp. (un champignon parasite de l'abeille) sur la production de l'EO par les abeilles.

Distribution of the Forager Pheromone (Ethyl Oleate) in the Honey Bee Colony

Résumé :

Les butineuses émettent une phéromone, l'EO, qui permet l'autorégulation du développement comportemental des ouvrières (nourrices) de la colonie par contact. Un nombre important de butineuses inhibe le développement comportemental des nourrices et inversement, un faible nombre de butineuses accélère la maturation des nourrices.

Des facteurs internes et externes au nid peuvent moduler les besoins en butineuses, et donc le ratio nourrices/butineuses. Nous avons voulu savoir si une possible fluctuation de l'EO pourrait être une réponse à des contraintes environnementales et des modifications du nid pour ajuster le ratio nourrices/butineuses. Nous avons également clarifié le mode de transfert de cette phéromone entre butineuses et nourrices.

Une étude de la quantité d'EO de différentes parties des butineuses, la tête, le thorax, l'abdomen, la cuticule, les pelotes de pollen, le nectar et le jabot a montré que le pollen des butineuses est un vecteur de l'EO ainsi que la cuticule des butineuses.

Parallèlement, pour étudier la dynamique de l'EO, des butineuses de pollen et de nectar ainsi que des nourrices ont été prélevées chaque mois durant deux années à chaque période de floraison (Mai à Septembre) dans trois ruches génétiquement différentes. Une augmentation de production du taux d'EO a été observée durant la période estivale. L'origine génétique des abeilles ne semble pas impliquée, alors que les conditions environnementales semblent jouer un rôle majeur.

Les contacts cuticulaires ou cuticule-antenne entre butineuses et nourrices sont nécessaires à la transmission de la phéromone inhibitrice et le pollen peut servir de stockage de la molécule, mais être également un vecteur lors de son ingestion et de son contact avec les abeilles nourrices.

La dynamique de production de l'EO montre une fluctuation en réponse aux contraintes environnementales. Il est nécessaire de savoir si les nourrices adaptent leur sensibilité à la phéromone et ajustent leurs développements comportementaux en fonction des fluctuations d'EO.

Distribution of the Forager Pheromone (Ethyl Oleate) in the Honey Bee Colony

Alban Maisonnasse¹, Jean Christophe Lenoir¹, Dominique Beslay¹, Didier Crauser¹, Yves Le Conte¹.

¹ INRA, UMR 406, Abeilles et Environnement, Laboratoire Biologie et Protection de l'Abeille, Avignon, France.

Key words: *Apis mellifera*, pheromone, nurse, forager, social regulation

En preparation.

Abstract:

Ethyl Oleate (EO) is a major primer pheromone of the honey bees produced by the foragers to delay the onset of foraging in younger individuals (hive bees) via a mechanism that requires physical contact. This signal is important in regulating the best ratio of foragers / hive bees to optimize colony development. But the pace of bee maturation depends on both internal (colony) and external (environment) factors. We asked whether colony or environmental factors could change the EO production, and clarified the mode of transmission of EO between foragers and hive bees.

Variation in EO production occurs in the nest during the active season. Genetics origin of bees does not seem to be involved, whereas environmental conditions appear to play a major role.

Foragers have 26% of the total forger EO amount on their cuticle and the pellets of pollen also contain EO. Thus hive bees could perceive EO by cuticle or antennae contact with forgers and by assimilating or manipulating the pollen in the hive.

The next challenge is to understand if workers adapt their behavioural maturation through differential sensitivity to EO variation in the colony. Chemical communication in the honey bee reveals an increasingly complex language with regards to the variation in signal production and nest regulation.

Introduction:

Animals communicate between each other using visual, acoustic, tactile and chemical signals (Wilson, Bossert, 1963). Among the different means, chemical communication between individuals is widespread among insects, and highly developed among social insects.

In the honey bee, a eusocial insect, communication by pheromones is used by the individual to indicate its needs but also to maintain the homeostasis of the colony (Le Conte, Hefetz, 2008; Slessor *et al.*, 2005a). Progress has been made toward decoding the honey bee chemical language. It is now known that pheromones in honey bees modulate individual interaction through their action on behavioral genes and individual physiology (Alaux *et al.*, 2009; Grozinger, Robinson, 2007). Recent studies have presented mechanisms of pheromone

integration and processing in the bee brain, and new descriptions of pheromone receptors (Wanner *et al.*, 2007) and biosynthesis (Malka *et al.*, 2009a) have been made. However, most of our knowledge about social insect pheromones involves the effect of releaser and primer compounds on workers but little is known about pheromone dynamics and translocation in the colony. In order to respond to variations inside and outside of the nest, workers change and coordinate their activities in relation to colony needs using a wide variety of information sources including pheromone variation (Robinson, 1992). The study of dynamic and translocation of pheromones becomes essential to improve the knowledge of bee communication and colony adaptation. When looking at the importance of synergy, dose and context, pheromone communication in honey bees appears to be remarkably complex (Slessor *et al.*, 2005b). The analysis of each pheromone is then necessary to understand this specific language and its role in bee social regulation.

In the colony, the queen mandibular pheromone (QMP) and the 9-ODA (9-oxodec-2-enoic acid, one compound of the QMP) are involved in regulating many social functions and continue to be highly studied (Barbier, Lederer, 1960; Butler *et al.*, 1962; Peters *et al.*, 2010; Slessor *et al.*, 1988; Slessor *et al.*, 2005a). But now, there are other important mechanisms (or social functions) known in the honey bee colony in which pheromones are involved.

Age-related division of labor among workers plays a major role in the organization of many insect societies (Robinson 1992), where division of labor is used to maximize colony development rate and reserve accumulation. In honey bees, to optimize colony development, an effective ratio of foragers (old bees) to hive bees (young bees) is required. The colony has a feedback mechanism between nurses and foragers, particularly adapted to regulate the size of the colony. One key of this self-regulating workforce is a social pheromone: Ethyl Oleate (EO) which is produced by the foragers (Leoncini *et al.*, 2004b). The EO signal slows down the natural progression of workers from hive bees to foragers (Leoncini *et al.*, 2004b). The queen (Keeling, Slessor, 2005) and the brood (Le Conte *et al.*, 1990) also produce EO in the colony but the main social regulation of the workforce appears to come from foragers (Huang, Robinson, 1996). When foragers are lost, hive bees are less inhibited in their maturation and they forage precociously. If a colony has too many foragers, the age progression of young bees slows down more than usual, until the correct proportion of foragers to in-hive sectors is reached.

EO is an important pheromone inside the colony to regulate bee behavioural development. But the pace of bee maturation depends on colony conditions, and the environmental, physiological and genetic parameters involved in this complex mechanism (Robinson, 1992). In addition, honey bees are able to respond to changes in colony needs by altering their typical patterns of age polyethism. This flexible system of division of labor is very important to colony fitness because the development of a bee colony continues despite constant changes in environmental (external and colony) conditions (Robinson, 1992). Also, genotypic differences in age-related division of labor in colonies occur in different honey bee subspecies. Bees of various genotypes have different development strategies: subspecies that invest quickly in foraging and subspecies that invest slowly in foraging (Giray, Robinson, 1994; Winston, Katz, 1982). This flexibility of colony structure (ratio foragers / hive bees) suggests a possible variation of EO rate in the colony.

We studied, during 5 months of the beekeeping season, two subspecies of honeybee *Apis mellifera mellifera* and *Apis mellifera ligustica* that differ in their development strategies (Brillet *et al.*, 2002) and genetic patterns (Whitfield *et al.*, 2006a) to investigate the regulatory network that controls colony responses that set the right ratio foragers / hive bees. This study investigated whether there is variation in EO production between the different lineages in response to their different strategies of development or to the environmental conditions.

Social regulation of bee behavioural maturation requires physical contact among bees. Older bees separated from younger bees via a screen that permits some forms of physical contact (food transfer, antennal contact, and licking) are able to inhibit behavioural maturation, but not when they are separated via double screen that prevents these interactions (Huang *et al.*, 1998; Leoncini *et al.*, 2004a). The transmission of EO is not well understood yet according to previous results, trophallaxis between nurse and forager, a form of food exchange but also thought to be a prominent means of communication in insect societies (Korst, Velthuis, 1982), seems to be the way to delay nurse maturation in the colony. But, as these results are not clear, we investigated how foragers could transfer EO to nurse bees in the colony. We analysed the EO level within food transferred between foragers directly to nurses; the nectar and indirectly; the pollen. Also because contacts (cuticle-cuticle or antennae) between nurses and foragers are frequent, we analysed the EO level on the forager cuticle, to see if EO could be exchanged by passive contact (friction) between the thousand of individuals in the colony.

The characterisation of this pheromone could improve our comprehension of bee social regulation and the importance of the proper ratio between foragers and hive bees.

Materials and Methods

EO chemical analysis

All samples were prepared in a solution A of 1.9 ml of iso-hexane with the addition of 100 μ l of two internal standard solutions at 10 ng/ μ l (arachidic acid methyl ester and methyl heptadecanoate, Sigma-Aldrich, France).

Total EO amount was analyzed on different samples (pool of 5 bees, load of pollen...). Each sample was crushed with a glass rod during 2 min at 4°C in the solution A and centrifuged for 20 min at 4°C (2,500 g). The cuticular extracts were prepared by rinsing 5 bees in the solution A for 1 min at 4°C.

Then the supernatant was collected and applied to a silica column (silica gel 60, particle size 40–63 μ m, 230–400 mesh). The first fraction was eluted in 3 ml of a solvent mixture (98.5% iso-hexane, 1.5% diethyl ether). Then, the second fraction containing the EO was eluted in 3 ml of a second solvent mixture (94% iso-hexane, 6% diethyl ether). 1 ml of this fraction was concentrated to 10 μ l under nitrogen stream and 1 μ l was injected into a gas chromatograph (2014, Shimadzu, Japan) equipped with a split-splitless inlet, a flame ionization detector and a capillary column Omegawax 100 (10 m x 0.10 mm, 0.10 μ m film thickness). The samples were injected in split mode. Hydrogen was used as carrier gas with a column flow of 0.52 ml/min. Oven temperature was set at 90°C for 1 min, raised to 195°C at 40°C min⁻¹, stabilized for 3 min, then augmented to 210°C at 1°C min⁻¹, stabilized again for 2 min then increased to 270°C at 40°C min⁻¹ and held at 270°C for 3 min. Identification and quantification of EO was based on retention times of EO synthetic compound (Sigma-Aldrich, France) and by comparison of internal standard area respectively using gas chromatography solution program (Shimadzu, Japan). The EO confirmation was done by a mass spectrometer (CP2010, Shimadzu, Japan) operated in the electron impact mode at 70 eV with continuous scans (every 0.2 sec) from a mass to charge ratio (m/z) of 70 to 400.

EO transmission (foragers to hive bees)

To gain insight into the mode of transfer of EO among bees in a colony, we measured EO levels in different honey bee parts: head, thorax, abdomen, cuticle, but also in the food transfer to nurse by the forager: the nectar and the pollen. Foragers used in the different experiments came from a typical field colony headed by a naturally mated queen. Foragers were caught by closing the hive entrance and immediately frozen at -20°C; before EO analysis. Each sample was analyzed for total EO levels with the methods described above.

First, to know the distribution of EO in foragers, we analysed EO levels in the 3 parts of foragers: head, thorax and abdomen. As a control we also measured the EO level of intact foragers. Ten groups of 5 bees were dissected for three lots of 10 samples of each honey bee sections (body parts) and 10 groups of 5 bees were kept unchanged (control). Before analyzing the EO the different samples were weighed in order to have the mean amount of EO per sections and also per mg of each section.

Then we studied EO on the cuticle of honey bee. Ten groups of 5 foragers were analysed for total EO amount as a control and cuticular extracts (rinse the cuticle) were made on 10 groups of 5 foragers to know the percentage of EO found on the cuticle.

Also the quantity of EO in nectar of foragers was examined. The EO level in the nectar sampled directly from the forager crop and the nectar regurgitated by the forager were quantified on two different groups because foragers could add secretions to the nectar from the hypopharyngeal gland during trophallaxis (Simpson, 1960; Simpson *et al.*, 1968). The abdomens of 6 groups of 5 foragers were dissected, an incision was made in order to clear the crop, and then with a syringe the crop content was sampled. The crop envelope was analyzed separately. In a second group of bees (6x5 foragers), nectar regurgitation was recovered by applying pressure on the abdomen with a forceps and the regurgitated nectar was collected with a microcapillary pipette and put in a 2mL vial. A third group of foragers (6x5) was analysed for the total amount of EO as a control.

In a final step the pollen load of foragers was considered as a potential transfer of EO between nurse and forager. Pollen is in contact with the forager cuticle before the formation of a pollen load and foragers add oral fluids during pollen handling (Winston, 1987). The pollen could be a way to distribute EO in the colony. We tested this hypothesis by an EO analysis of pollen

load, bee bread (stock of pollen inside the hive) and pollen-carrying forager with pollen load removed (control). In two hives, one day before the experiment at the end of the day an empty frame inside the hive was added. The following day in the afternoon a wire screen was placed in front of the hive entrance, 50 pollen foragers blocked from entering were caught and separated from their pollen load, all the samples were immediately frozen. Then the frame from the previous day was removed and the fresh bee bread collected from comb cells. We analysed EO on 10 groups of 5 foragers without their pollen load, 14 samples of 10 pollen loads, and 10 samples of 10 bee breads. Each sample of beebread and pollen was weighed before analysis.

In addition, as a control for the pollen experiment, we measured EO rates in the pollen of different flowers to be certain that EO came from the foragers. We picked anthers of the five important flowers in blossom (*Onobrychis viciifolia*, *Pyracantha coccinea*, *Cucumis melo*, *Phacelia tanacetifolia*, *Carduus pycnocephalus*). For each type of flower, five samples were made with 30 to 100 mg of flower anther and analysed for EO trace.

Differences in EO levels on the different parts of workers were analyzed by a Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann–Whitney U post-hoc tests. The differences in the EO level inside the bee bread and the pollen load were analysed by a Mann–Whitney U tests.

EO variation on beekeeping season and on honey bee genetic sources

We followed the EO levels in three hives every month from May until September on three groups of bees: pollen foragers, nectar foragers and nurses. The hives were placed in the same apiary (same environment), and were distant in genetic profile (*A. m. mellifera*, *A. m. ligustica* and one hybrid hive headed with a natural mated queen).

To obtain nurses of 10 days in age, we used one day old bees. Eleven days before the bee sample, one frame containing last nymphal stage was removed on each hive, and placed separately in an incubator (33°C, 60%RH). The day after one-day-old bees appeared on the comb. These one-day-old bees were marked with an appropriate paint and reintroduced into their initial hives.

To sample the bees, the nurses (painted bees of 10 days old) were caught inside the hive on an open brood frame. After, the hive entrances were closed, foragers that returned after their foraging trip accumulated on the screen. The pollen foragers (bees with pollen loads) and nectar forgers (bees with distended abdomen) were captured with special forceps and placed separately in two boxes. All samples were immediately frozen at -20°C.

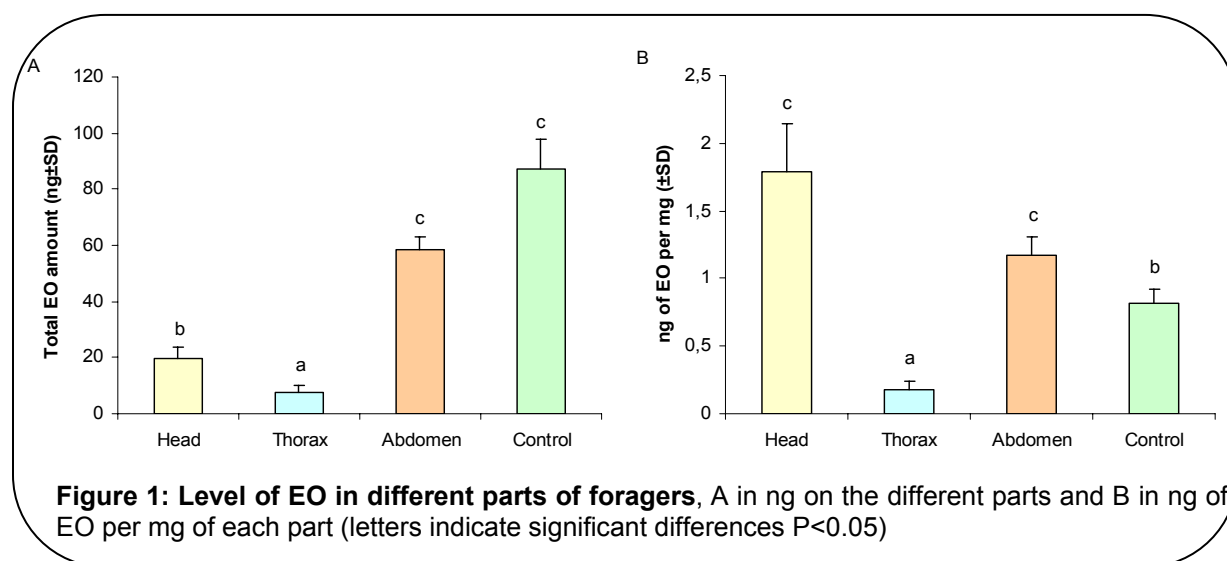
Four groups of 5 bees of each modality (pollen foragers, nectar foragers and nurses) were analysed for EO level every month on the three hives. We performed the experiments two consecutive years on three different hives for the two races and on the same hybrid hive. The temperatures were followed from May until September.

The results of the two-year experiment were first analysed separately by a two-way ANOVA (hives and bee groups) followed by a Fisher post-hoc test. The level of EO was transformed: $y'=\ln(y+1)$ to attain variance homogeneity. Then the difference in EO levels between the first and the second years was analysed by a Mann–Whitney U tests, and the differences in the EO level by month by a Kruskal-Wallis ANOVA test.

Results

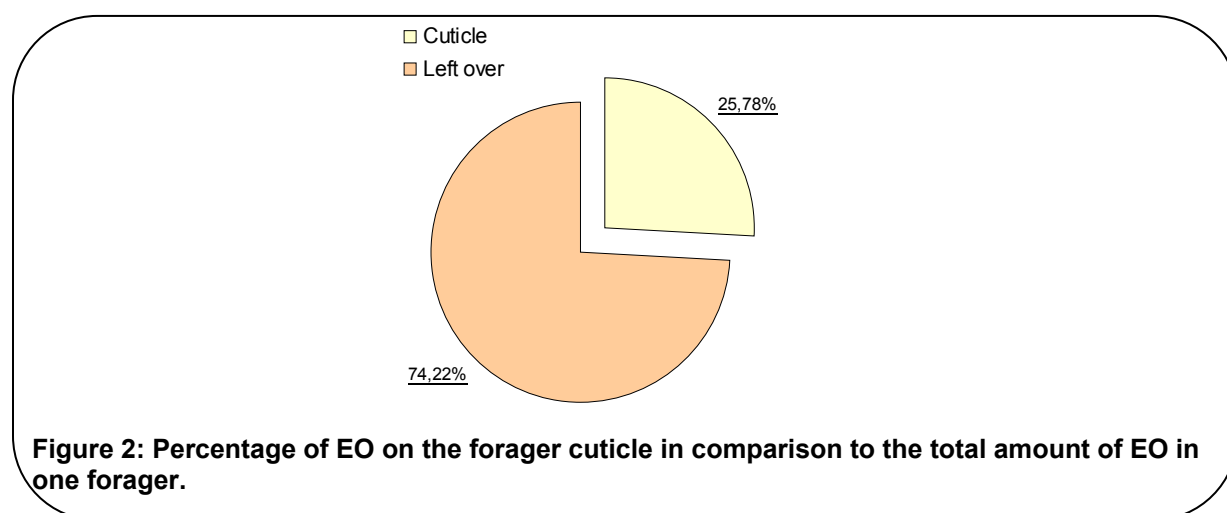
EO distribution in forager

Forager analyses:



Analysis of the different forager parts showed a significant difference in EO distribution in the three sections (Fig.1): EO amount per section (N =30 H =18.1, df =3, P <0.001) and EO amount per mg of each section (N =30 H =16.31, df =3, P <0.001). Considering the total EO amount per section, the majority of EO was found in the abdomen (69%) (58.34±4.91 ng of EO). This quantity is significantly higher in comparison to the two other parts: the head 23% (19.75± 3.74 ng of EO) (Z = -0.302, P <0.01) and the thorax 9% (7.52± 2.63 ng of EO) (Z =

–3.780, $P < 0.001$). At the EO concentration per mg of each sections, EO was equally concentrated in the head (1.74 ± 0.36 ng of EO/mg) and in the abdomen (1.18 ± 0.13 ng of EO/mg) ($Z = -1.436$, $P = 0.15$) and significantly less abundant in the thorax (0.18 ± 0.06 ng of EO/mg) (head vs thorax $Z = -0.317$, $P < 0.01$ and abdomen vs thorax $Z = -0.363$, $P < 0.01$). The EO amount on the cuticle (16.75 ± 3.74 ng of EO) was 26% percent of the total EO amount found in a forager (64.99 ± 9.04 ng of EO) (Fig.2).



Pollen and nectar analyses:

The nectar did not contain any trace of EO in our experiments; no trace of EO was found in the nectar inside the crop nor in the nectar regurgitated (Table 1). EO was only found in the crop's envelope which represented 12% of the total amount of EO in a forager.

Table 1: EO level in nectar forager and in the different parts of nectar forager.

	OE rates (ng)	SD
Crop envelope	8,89	4,03
Nectar inside crop	0,00	0,00
Regurgitate nectar	0,00	0,00
Nectar forager	72,84	26,28

Unlike the nectar, the pollen contained EO. The EO amounts per 100 mg of pollen load or bee bread were the same (hive 1: $Z = -1.757$, $P = 0.07$ and hive 2: $Z = -1.197$, $P = 0.23$). Two pollen loads (4.5 ± 1.2 ng of EO) represented 17% of the total amount in the pollen foragers (21.9 ± 3.8 ng of EO). We did not find EO in any of the pollen extracted from the appropriate flowers.

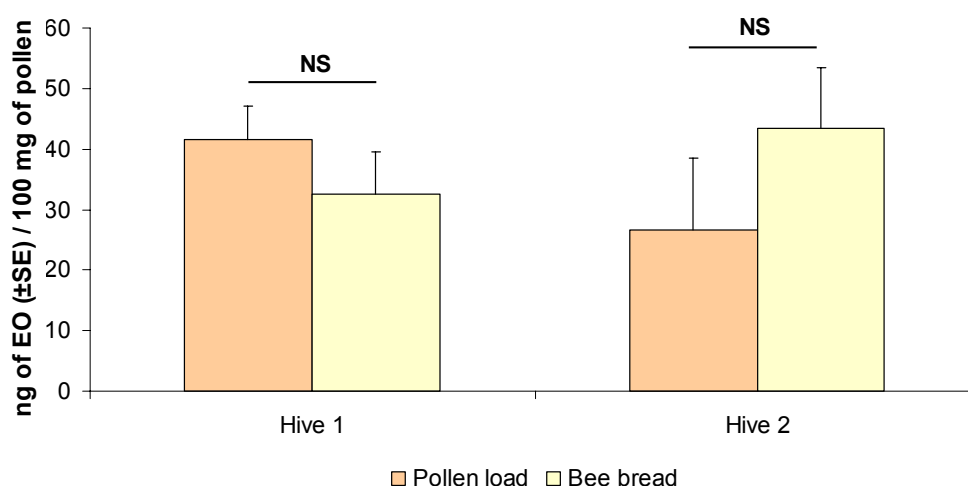


Figure 3: Total EO amount in 100mg of pollen pellets and bee bread from two hives.

EO variation during the beekeeping season

We did not find any significant hive effects on EO titers per bee, but we found differences according to bee groups (nectar foragers, pollen foragers and nurses) in 2008 (Hives: $F_{2,179}=0.95$, $P=0.39$, Bee groups : $F_{2,179}=39.58$, $P<0.001$, Interaction : $F_{4,359}= 1.19$, $P=0.32$) and 2009 (Hives: $F_{2,179}=2.70$, $P=0.07$, Bee groups : $F_{2,179}=48.01$, $P<0.001$, Interaction : $F_{4,359}= 1.40$, $P=0.23$). Because no differences were found between the EO rates on the three hives, the results were pooled (Fig 4). In 2008, nectar foragers had a significant higher level of EO in comparison to pollen foragers and nurses (Nectar vs Pollen: $P<0.001$, Nectar vs Nurse: $P<0.001$), and pollen foragers had higher levels of EO than nurses (Pollen vs Nurse: $P<0.001$). In 2009 the EO level of pollen and nectar foragers were the same (Nectar vs Pollen: $P=0.21$) but were significantly higher than in nurses (Nectar vs Nurse and Pollen vs Nurse: $P<0.001$).

The EO honey bee titers change with years ($Z=-4.68$, $P< 0.001$) and with months in 2008 ($N = 360$, $H = 43.32$, $df = 4$, $P < 0.001$) and in 2009 ($N = 360$, $H = 23.8$, $df = 4$, $P < 0.001$).

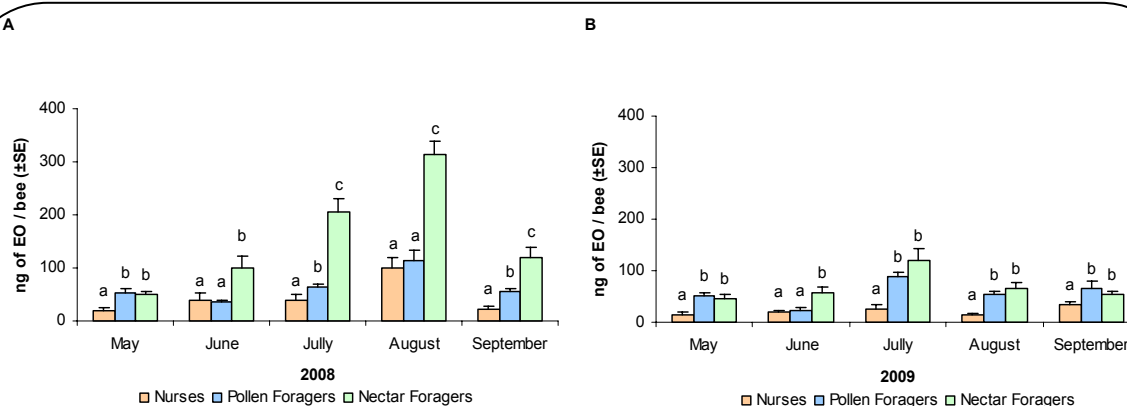


Figure 4: EO amount during seasons 2008 (A) and 2009 (B) in nurses, pollen and nectar foragers. a, b, c denote significant differences $P<0.05$ between the three group of bee each month.

Discussion

EO is a major pheromone in social regulation of honey bee, being a part of the signal expressed by forager to slow down the maturation of nurses (Leoncini *et al.*, 2004b). The two modes of EO transmission by foragers to nurses seem to be by cuticle contact (antennae and friction) and through the pollen. Variation in EO production occurs in the colony during the beekeeping season. In our experimental conditions the colony genetic origin (race) did not matter, whereas environmental conditions played a major role in this pheromonal variation. Specifically, the season and the foraging specialization of the bees had an effect on EO titers.

Physical contact is required for older bees to inhibit endocrine and behavioral development in younger bees (Huang *et al.*, 1998). EO, as a contact pheromone due to its weak volatility, must be transmitted during food transfer, antennal contact, or licking. Workers seem to perceive colony information via stimuli emanating from the nest during "patrolling" behaviour (Lindauer, 1952). It seems to be also conveyed during trophallaxis (Free, 1965). After measuring its rates in the different parts of foragers, EO appears to be equally distributed in the head and the abdomen and significantly less abundant in the thorax. EO on the cuticle is about 26 % of the total amount of EO in foragers. Thus the EO transfer can be done by cuticle-cuticle or antennal-cuticle contact.

In contrast, the nectar, inside the crop or regurgitated, has no trace of EO, whereas the crop envelope alone contains 12% of the total amount of EO in foragers. The trophallaxis of nectar doesn't seem to be the mode of EO transfer as suggested by Leoncini *et al.* (2004b). During trophallaxis both workers touch each other frequently by antennal contact (Korst, Velthuis, 1982), which supports, because EO is on the cuticle, a possible transfer of EO during trophallaxis through this antennal contact. In comparison, 9ODA is found at 0.67% on the queen cuticle, which is approximately equal to 1000ng of 9ODA, and workers surrounding the queen after 30s have 30 ng of 9ODA (Naumann *et al.*, 1991). Foragers have approximately a total EO level of 100 to 150 ng, with 25 to 37.5 ng on the cuticle, which would allow, in a single contact of 30 sec, nurses to remove 1ng of EO from the foragers.

EO is found on pollen load (17% of the total forager EO amount), in the same proportion as in the bee bread and not found in the pollen of flowers (anthers). So we suggest that a part of EO is provided by pollen foragers in the pollen pellets and the bee bread. Pollen is gathered from

floral anthers by active movements of the legs and the proboscis scraping the anthers, as well as by pollen which drops passively onto the body hairs of workers (Winston, 1987). Subsequently, as the pollen foragers brush their proboscis, clean pollen from their head and their thorax with their forelegs, EO can be added passively by the transfer of EO found on the cuticle. EO can also be directly added in the regurgitation of honey and other substances for the formation of the pollen pellets by the foragers.

When the pollen foragers finish their pollen collecting and return to the hive, they remove their pellets of pollen from their basket directly into pollen cells. Then other workers (hive workers considered as nurses) pack the pellets for storage using their mandibles and forelegs to press the pollen (Winston, 1987). Pollen nourishment during the first 8-10 days of workers' life is essential for proper post-emergence glandular development and growth of internal structures (Haydak, 1970). Therefore, nurses eat and are in contact with pollen, and presumably assimilating EO. The pollen is a mode of EO transmission inside the colony, but also a possible way to store EO. In the colony, when pollen foraging amplifies, the amount of bee bread increases which also increases the quantity of EO inside the colony. As the function of EO is to delay the age at onset of foraging, the accumulation of EO inside the bee bread could be a signal to decrease the foraging activity, by delaying the maturation of nurses.

The augmentation of the amount of stored pollen in the colony concurrently increases brood rearing and decreases pollen foraging activity to a homeostatic set point (Fewell, Winston, 1992). In addition, pollen foraging decreases only when foragers have direct access to stored pollen (Dreller *et al.*, 1999). Therefore, EO could be the inhibitory signal of foraging, first by decreasing the behavioural maturation of nurses to reduce foraging activities, and second by having a direct action on pollen foraging. This second hypothesis needs to be tested.

The modification of colony age structure is one aspect of the environment that changes throughout the year owing to changes in worker age at first foraging. Different factors can alter the division of labour of a colony including internal and external hive factors (Robinson, 1992). Here we demonstrated that the EO level varies in the colony between months of the beekeeping season. That would suggest a difference in the control of nurse behavioural development by foragers over the months. The EO level is weak at the beginning of the season when the demand in foraging is high due to an abundance of flowers in the area. Then EO level increases in July and August when fewer flowers are found in the area, thus the demand for a forager force is less. When in September there is a renewal of flowers blooming in the area, the forager workforce increases and the EO level decreases. Environmental

conditions seem to play a major role in the workers' behavioural maturation, and correspondingly, the ovary, vitellogenin titre, and JH level of worker bees respond to changing environmental conditions (Huang & Robinson 1995; Amdam et al. 2004a; Linksvayer et al. 2009) and then to worker' pheromonal levels.

Racial differences are important components of the division of labour among worker honey bees. *A. m. ligustica* bees have faster rates of behavioural development than *mellifera* (Brillet et al., 2002), with a demonstrated genetic mechanism conferring these differences (Whitfield et al., 2006a), yet their production of EO is the same. Thus it seems that racial differences, between *ligustica* and *mellifera* nurses, in the sensitivity to the social inhibitor could be responsible for differences in rates of behavioural development. Racial differences in sensitivity to social factors have been previously observed as genotypic differences in response thresholds to task-related stimuli (Beshers et al. 1999).

Recent studies have demonstrated that *Nosema* spp. (honey bee parasite) significantly alter EO production in the honey bee colony (Dussaubat et al., 2010). Therefore it is now important to determine if bees are sensitive to this variation in EO level in the colony and adjust their maturation to a lower ratio of foragers to hive bees in response to the disease (which causes an increase of EO titers) or in response to a loss in foragers (which causes a decrease of EO titers). Studies on QMP show that workers discriminate between different queen's pheromone extracts (Kocher et al., 2010; Kocher et al., 2009). Workers are more attracted by pheromone extracts of queens with higher levels of ovary activation (Kocher et al., 2009). In addition there are strong genetic and seasonal components to QMP response by worker honey bees (Pankiw et al., 1994; Pankiw et al., 1995). Thus we predict that workers are also sensitive to EO fluctuation but new studies are needed to understand if bees respond to EO differentially during the season and to different levels of EO.

Honey bee colonies seem to adjust their EO production to environmental changes. In the honey bee colony, production of a signal is modulated and responders are able to perceive this variation and adjust their responses (Hoover et al., 2005b; Kocher et al., 2009; Pankiw et al., 1994). The complexity of the chemical communication in honey bee reveals a more complex language between emitters and receivers than previously thought, regarding the variation in signal production and responses by workers in the colony.

Acknowledgements

We thank Nicolas Boyer, Vincent Marteau, Lauren Tomasella, Thomas[†] and Martin Le Conte, for their help in the experimental set up and lab and field experiments; Christian Gines for his assistance in chemical analysis.

Transition :

La découverte d'une production dynamique de la phéromone EO en fonction de la saison renseigne le fait que les abeilles puissent s'adapter aux conditions externes de la ruche. La transmission de cette molécule par contact indique que tous les individus actifs ou inactifs reçoivent l'information par simple contact dans la colonie. Ainsi, il est possible que lorsqu'un certain seuil de présence de cette phéromone est dépassé (après un certain nombre de contacts, accumulation d'EO sur la cuticule), l'abeille répond à ce stimulus.

La transmission par le pollen permet un stockage de la phéromone dans la colonie et constitue un moyen d'indiquer les besoins en butineuses : une réserve accrue de pollen dans la ruche revient à un fort taux d'EO dans la colonie, ce qui induirait un ralentissement de la maturation des nourrices.

L'EO est une phéromone majeure dans la régulation du nombre de butineuses et de nourrices pour le développement de la colonie, une modification de son taux « normal » peut déstabiliser les mécanismes de la communication dans la colonie. Après avoir analysé la dynamique et la transmission de l'EO dans la colonie, les résultats de l'article suivant présentent l'impact de stress externes, un pesticide et une maladie de l'abeille, sur la production de l'EO. Aujourd'hui, les causes importantes de mortalité d'abeilles de par le monde semblent être d'origine multifactorielle. Nous avons voulu savoir si des facteurs de stress peuvent désorganiser la communication chimique et expliquer en partie les syndromes d'affaiblissement des colonies.

***Nosema* spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (*Apis mellifera*)**

Résumé :

Chez les insectes sociaux, et notamment chez l'abeille domestique, les phéromones participent activement à l'homéostasie du groupe. Les parasites ou les maladies peuvent modifier les taux hormonaux de leur hôte. Dans la littérature, la colonie peut être comparée à un superorganisme, les abeilles sont vues comme les cellules et les phéromones comme des hormones. Dans un organisme, un stress peut entraîner un bouleversement hormonal induisant de grandes complications. Nous avons donc voulu savoir si, comme pour les hormones, des stress pouvaient modifier les taux de phéromones dans la colonie d'abeilles et perturber son fonctionnement.

Des facteurs de stress environnementaux, tels que les pesticides ou des maladies, peuvent affaiblir les colonies d'abeilles. Nous avons alors analysé l'effet de l'imidaclopride, un pesticides de la famille des néonicotinoïdes largement utilisés en agriculture, et l'effet *Nosema* spp., un parasite généraliste de l'abeille, sur la production d'EO par les ouvrières.

Des abeilles ont été exposées en cagette au pesticide et au pathogène. Après 10 jours, les taux d'EO des abeilles traitées et des contrôles ont été analysés. Contrairement à l'imidaclopride, *Nosema* spp. modifie la production de l'EO. Le niveau d'infection des abeilles par *Nosema* spp. est positivement corrélé avec leur niveau de production d'EO.

En conséquence, comme l'EO est impliqué dans la régulation de la division du travail des ouvrières, nos résultats suggèrent que des augmentations de production d'EO par des abeilles infestées par le parasite peuvent perturber la communication chimique de la colonie et donc son homéostasie.

***Nosema* spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (*Apis mellifera*)**

Claudia Dussaubat^{§1}, Alban Maisonnasse^{§1}, Cedric Alaux¹, Sylvie Tchamitchan², Jean-Luc Brunet², Erika Plettner³, Luc P. Belzunces², Yves Le Conte¹

¹ INRA, UMR 406 Abeilles et Environnement, Laboratoire Biologie et Protection de l'abeille, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

² INRA, UMR 406 Abeilles et Environnement, Laboratoire de Toxicologie Environnementale, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

³ Department of Chemistry, Simon Fraser University, Burnaby, BC, Canada V5A 1S6

[§] Equal contribution

Key words: Primer pheromone, honey bee, ethyl oleate, *Nosema* spp., imidacloprid.

Journal of Chemical Ecology, Vol 36, Issue 5, 522-525, 2010

Abstract:

Pheromones in social insects play a key role in the regulation of group homeostasis. It is well-established that parasites can modify hormone signaling of their host, but less is known about the effect of parasites on pheromone signaling in insect societies. We thus tested in honey bees (*Apis mellifera*) the effect of the widespread parasite *Nosema* spp. on the production of ethyl oleate (EO), the only identified primer pheromone in honey bee workers. Since environmental stressors like pesticides can also weaken honey bees, we also analyzed the effect of imidacloprid, a neonicotinoid widely used in agriculture, on EO production. We show that, contrary to imidacloprid, *Nosema* spp. significantly altered EO production. In addition, the level of *Nosema* infection was positively correlated with the level of EO production. Since EO is involved in the regulation of division of labor between workers, our result suggests that the changes in EO signaling induced by parasitism have the potential to disturb the colony homeostasis.

Introduction

Analogous to the hormones that control the organism homeostasis, pheromones in social insects play a key role in the regulation of group homeostasis. However, the homeostasis of both organisms and insect societies can be threatened by parasite infection. For example, in mammals there is clear evidence that parasites can modify the endocrine system of the host to favor their development and reproduction (Escobedo *et al.*, 2005). In honey bees, the cuticular hydrocarbon profile involved in social recognition can be altered by an activation of the immune system (Richard *et al.* 2008) or parasitization by the mite *Varroa destructor* (Salvy *et al.*, 2001). However, it is not known whether, analogous to the modification of hormone signaling in the organism, parasites can affect pheromone signaling in insect societies.

To answer this question, we asked whether the microsporidia *Nosema* spp., potentially involved in the worldwide honey bee losses (Higes *et al.*, 2008), could affect the production of pheromone in workers. We analyzed the production of the only identified primer pheromone in workers: ethyl oleate (EO), which regulates worker behavioral maturation (i.e. inhibits the transition from inside-nest tasks performed by young bees (nurse) to foraging tasks performed by old bees (forager) (Leoncini *et al.*, 2004b). The focus was done on primer pheromone because they are essential to the regulation of social behaviours and colony

homeostasis. Therefore, a modification in their production could affect the whole colony organization and endanger its survival. Since the survival of honey bees can be threatened by other stressors, like pesticides, we also tested the effects of a neonicotinoid (imidacloprid) widely used in agriculture on EO production. Pesticides are known to disrupt pheromone perception but they can also affect their production (Desneux *et al.*, 2007).

Methods and Materials

Nosema infection and imidacloprid exposure. This experiment was part of a larger study described in details by Alaux *et al.* (2010a). Briefly, in order to test the effect of *Nosema* infection and/or imidacloprid exposure, one-day old bees were reared in cages and split into four experimental groups: control groups, groups infected with *Nosema*, groups exposed to imidacloprid and groups both infected with *Nosema* and exposed to imidacloprid. For each experimental group, 3 colonies were used, with 2 cage replicates for each colony ($N=120$ bees per cage). For the *Nosema* infection, bees were individually fed at the beginning of the experiment, with a sugar solution containing 200,000 spores (Alaux *et al.*, 2010a). Spores were previously isolated from infected colonies as in Higes *et al.* (2007) and genetic analysis showed that our bees were infected with both *N. apis* and *N. ceranae* (see Alaux *et al.*, 2010a). For the pesticide exposure, caged bees were chronically exposed 10 hr per day to imidacloprid by ingesting a sugar solution containing 7 $\mu\text{g/kg}$ of imidacloprid (concentration encountered in the environment) (see Alaux *et al.*, 2010a). The solution was replaced each day. After 10 days, bees were collected and stored at -20°C in order to measure the level of EO and *Nosema* infection.

EO quantification. Pools of 5 bees were analyzed. Whole-body extracts were prepared in 1.9 ml of iso-hexane with the addition of 100 μl of two internal standard solutions at 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (arachidic acid methyl ester and methyl heptadecanoate, Sigma-Aldrich, France). Samples were crushed with a glass rod during 2 min at 0°C and centrifuged for 20 min at 4°C (2,500 g). The supernatant was collected and applied to a silica column (silica gel 60, particle size 40–63 μm , 230–400 mesh). The first fraction was eluted in 3 ml of a solvent mixture (98.5% iso-hexane, 1.5% diethyl ether). Then, the second fraction containing the EO was eluted in 3 ml of a second solvent mixture (94% iso-hexane, 6% diethyl ether). 1 ml of this fraction was concentrated to 10 μl under a nitrogen stream and 1 μl was injected into a fast gas

chromatograph (2014, Shimadzu, Japan) equipped with a split-splitless inlet, a flame ionization detector, and a capillary column Omegawax 100 (10 m x 0.10 mm, 0.10 μm film thickness). The samples were injected in split mode. Hydrogen was used as carrier gas with a column flow of 0.52 ml/min. Oven temperature was set at 90°C for 1 min, raised to 195°C at 40°C min⁻¹, stabilized for 3 min then augmented to 210°C at 1°C min⁻¹, stabilized again for 2 min then increased to 270°C at 40°C min⁻¹ and held at 270°C for 3 min. Identification and quantification of EO was based on retention times of EO synthetic compound (Sigma-Aldrich, France) and by comparison of internal standard area respectively using gas chromatography solution program (Shimadzu, Japan). The EO confirmation was done by a mass spectrometer (CP2010, Shimadzu, Japan) operated in the electron impact mode at 70 eV with continuous scans (every 0.2 sec) from a mass to charge ratio (m/z) of 70 to 400.

Nosema spore counting. Since *Nosema* is an intestinal parasite, the honey bee intestinal tract was dissected and macerated in distilled water as in Higes et al. (2007). Then, the spore concentration from the suspension was determined using a haemocytometer.

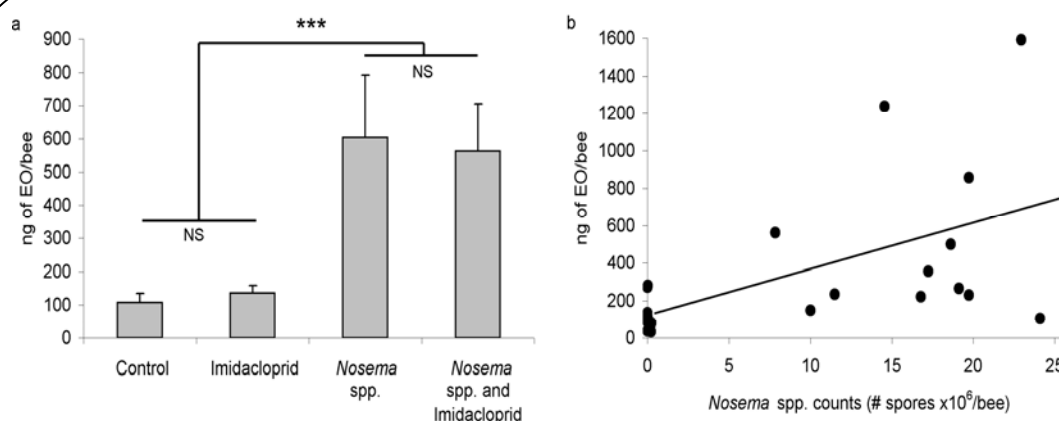


Figure 1: Effect of *Nosema* infection and/or imidacloprid exposure on EO production in honey bee workers. a EO level for each experimental group. Two pools of 5 bees per cage were analyzed, with 2 cages per treatment. The experiment was replicated on 3 colonies giving a total of N=60 bees per treatment. Treatment and colony effects were determined using two-way ANOVA on log-transformed values followed by Fisher post-hoc tests. There was a significant treatment effect on EO production ($F_{3,47}=17.35$, $P<0.001$). Bees infected with *Nosema*, with or without an exposure to imidacloprid, had a higher level of EO than control and imidacloprid-exposed bees ($P<0.001$ for each comparison). However, imidacloprid did not affect EO production (control vs. imidacloprid-exposed bees: $P=0.81$; *Nosema*-infected bees vs. *Nosema*-infected and imidacloprid-exposed bees: $P=0.14$). There was also a significant effect of colony origin ($F_{2,47}=4.59$, $P=0.017$) but no significant interaction with the treatments was found ($F_{6,95}=0.88$, $P=0.52$) demonstrating a consistent effect of the treatments. Data show mean $\pm$ SE. *** and NS denote significant ($P<0.001$) and non-significant differences between treatments, respectively. b Relation between EO production and the level of *Nosema* infection. There was a significant positive correlation between the quantity of EO produced and the number of *Nosema* spores infecting bees.

Results and Discussion

Nosema infection caused a significant increase in EO production compared to non-infected groups (Fig. 1a), demonstrating that pheromone production can be modified by environmental stressors. However, EO production in imidacloprid-exposed bees did not differ significantly from non-exposed bees (Fig. 1a). Neonicotinoids target the nicotinic acetylcholine receptors and so can affect neural function (Decourtye *et al.*, 2004) but here no effect was found on pheromone production. Studies with different pesticides are needed to determine whether this absence of modification we observed is a general phenomenon.

One would expect that *Nosema* infection induces a cost to pheromone production. Contrary to this expectation, parasitized bees produced more EO than healthy bees. Since, EO is present at higher levels in foragers compared to nurses (Leoncini *et al.*, 2004b) and *Nosema* causes a precocious onset of foraging (Wang, Mofler, 1970), the EO increase might reflect a forager profile of infected bees compared to control bees. However, further investigations tend to show that the EO increase is not just a consequence of a forager profile. First, the level of EO in parasitized bees was 6 times higher than healthy bees, which is greater than the difference naturally found between nurses (young bees) and foragers (old bees) (100 ± 19 ng EO/nurse, $n=60$ and 213 ± 25 ng EO/forager, $n=120$, unpublished data from $n=3$ colonies, A. Maisonnasse). Second, there was a positive and significant relationship between EO level and the number of *Nosema* spores per bee (Fig. 1b), showing that the EO increase is not an all-or-nothing response but is linked to the level of *Nosema* infection.

Even if the earlier onset of foraging could be a bee response to decrease the *Nosema* load within the hive, the higher EO level in infected bees has the potential to disturb the colony organization. The abnormally high level of EO could mislead the colony on the actual number of foragers and delay the onset of foraging in non-infected nurses, but it is not known how infected bees, who accelerate their behavioral maturation, would react to the high inhibitory effects of EO. On the other hand, since *Nosema* infection decreases worker lifespan (Higes *et al.*, 2007), a loss of EO in the colony can also be expected and accelerate nurse maturation. Field studies are needed to determine the actual response of the colony and whether a failure in pheromone communication induced by parasitism or a disease can lead to the colony collapse.

To our knowledge, this is the first demonstration that parasites can modify pheromone production in insect societies. Therefore, our finding indicates that pathogens, besides their effect at the individual level, can also cause damage at the social level.

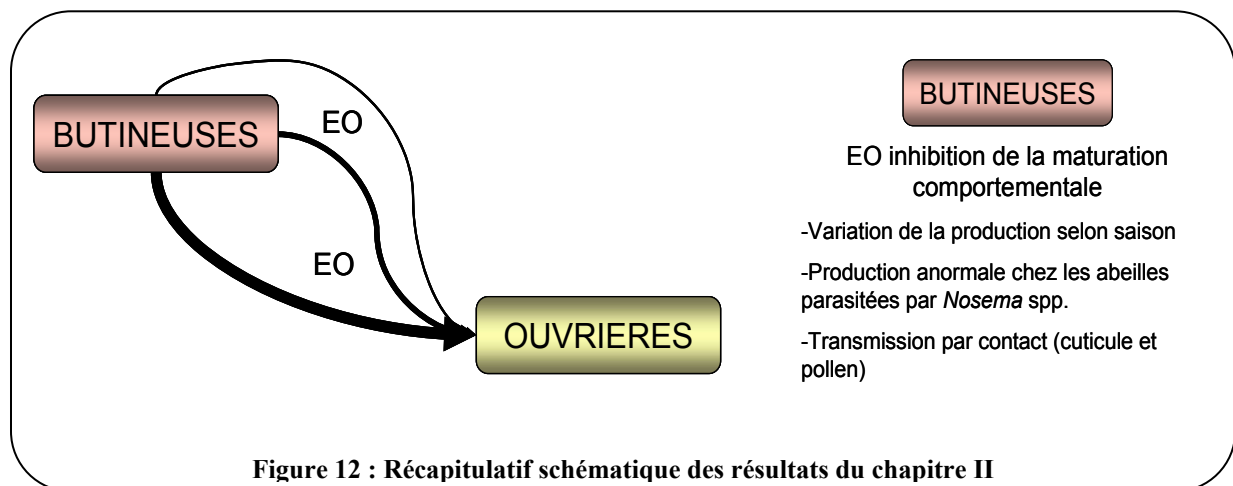
Acknowledgements

We thank D. Beslay, V. Marteau, C. Gines and lab members for assistance with bees. Fundings were provided by HFSP (RGPP0042/2007-C101) and FEOGA grants. C. Dussaubat, A. Maisonnasse and C. Alaux were supported by a CONICYT/French Embassy of Chili grant, a HFSP grant (RGP0042/2007-C101) and an INRA young researcher position (INRA SPE department), respectively.

Transition :

La production de l'EO varie en fonction de l'environnement de la ruche et le parasite *Nosema* spp. augmente anormalement sa production (Fig. 12). La prochaine étape de cette étude consiste à comprendre si les variations de production de l'EO engendrent des variations de réponse des ouvrières et un changement dans leur développement comportemental.

L'étude complète d'une phéromone est difficile en raison de la complexité de la société d'abeilles (contexte, synergie...). La phéromone la plus étudiée chez l'abeille est la QMP et plus particulièrement le 9-ODA. Malgré les connaissances des effets pleiotropiques de cette phéromone, il semblerait que cette phéromone ne soit pas la seule utilisée par la reine pour contrôler la colonie. Dans le chapitre suivant nous avons étudié la possibilité d'un signal redondant chez la reine qui lui permettrait d'appuyer son rôle d'individu central de la colonie.



Chapitre III La QMP est-elle la phéromone centrale de la colonie d'abeilles ?

Chapitre III La QMP est-elle la phéromone centrale de la colonie d'abeilles ?

Avant propos :

La reine est un élément central de la colonie, elle permet la cohésion de la colonie par l'émission de phéromones, et le maintien de la colonie par sa ponte. Sans reine, plus de cohésion sociale, les ouvrières commencent à développer leurs ovaires, d'autres bâtissent des cellules royales, la colonie se fissure, change de reine ou peut mourir.

La reine est l'individu de la colonie le plus étudié pour ces phéromones. Depuis 50 ans et la découverte de la première phéromone royale, le 9-ODA, la reine a été analysée par de nombreux chercheurs pour identifier d'autres molécules phéromonales. Il y a 20 ans, la QMP, composée de 5 molécules synergiques, dont le 9-ODA, produites dans les glandes mandibulaires de la reine, a été identifiée avec de forts effets physiologiques sur les ouvrières (inhibition des ovaires des ouvrières) et incitateurs (phénomène de cour).

Mais malgré la découverte de nouveaux composés synergiques à la QMP, qui forment la QRP pour l'induction du phénomène de cour, de nombreuses recherches ont été entreprises pour savoir si la QMP est la phéromone centrale de la colonie d'abeilles. Des études suggèrent l'existence de molécules complémentaires à la QMP produites dans la glande de Dufour ou de la glande tergale de la reine.

Dans ce chapitre nous nous sommes intéressés à mettre en évidence un potentiel second système phéromonal chez l'abeille. Ce travail est la prémisse à des travaux ultérieurs pour caractériser de nouvelles phéromones royales.

Dans cette étude, nous avons voulu savoir si la QMP est indispensable à la reine lorsqu'on ôte chirurgicalement ses glandes mandibulaires. Une analyse chimique de ces reines démandibulées a permis de quantifier les différentes molécules de la QMP. Puis, nous avons comparé le comportement et la physiologie des ouvrières en présence et en absence de ces reines démandibulées.

New Insights into Honey Bee (*Apis mellifera*) Pheromone Communication. Is The queen Mandibular Pheromone Alone in Colony Regulation?

Résumé :

Chez les insectes sociaux, la reine est essentielle pour le fonctionnement et l'homéostasie de la colonie. La reine est un élément indispensable de la colonie, elle permet à celle-ci de se renouveler grâce à la ponte de 1500 à 2000 œufs par jour, mais produit également des phéromones permettant la régulation de la société grâce notamment à la QMP (produite dans les glandes mandibulaires). Bien que la QMP ait des effets pléiotropiques sur la régulation de la colonie, cette phéromone n'induit que des effets partiels sur le comportement et la physiologie des ouvrières en comparaison des effets induit par la reine elle-même. Ainsi, la reine semble posséder d'autres composés phéromonaux supplémentaires.

Nous avons testé l'hypothèse d'une redondance phéromonale chez les reines d'abeilles, leur permettant d'avoir plusieurs phéromones pour le même signal. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé l'influence des reines avec ou sans glandes mandibulaires sur le comportement et la physiologie des ouvrières.

Les glandes mandibulaires des reines ont été chirurgicalement excisées. Le comportement et la physiologie des ouvrières en présence de reines opérées et de reines intactes ont été étudiés en cagettes et ruches vitrées, comparativement à des abeilles sans reine. Le développement des ovaires des ouvrières, la construction de cire et le phénomène de cour ont été mesurés. Et, pour la première fois, les profils chimiques des reines démandibulées et des reines intactes ont été analysés et comparés.

Nous n'avons pas détecté de 9-ODA, principal composé de la QMP, chez les reines démandibulées. Par contre nous avons trouvé chez ces reines du 9HDA en quantité moindre que chez des reines intactes et les mêmes quantités de HOB. Malgré une différence de production des composés de la QMP, les reines démandibulées contrôlent le comportement (construction de cire et phénomène de cour) et la physiologie (inhibition des ovaires) des ouvrières aussi efficacement que les reines intactes.

Nous avons démontré que la reine utilise d'autres phéromones aussi puissantes que la QMP afin de contrôler la colonie et notamment sa reproduction. Les reines semblent avoir plusieurs composés actifs ayant des fonctions similaires dans la colonie (redondance des phéromones). La colonie possède une syntaxe particulière utilisant plusieurs composés, lui conférant un avantage dans son développement.

New Insights into Honey Bee (*Apis mellifera*) Pheromone Communication. Is The queen Mandibular Pheromone Alone in Colony Regulation?

Alban Maisonnasse^{1§}, Cédric Alaux¹, Dominique Beslay¹, Didier Crauser¹, Christian Gines², Erika Plettner³, Yves Le Conte¹

¹ INRA, UMR 406, Abeilles et Environnement, Laboratoire Biologie et Protection de l'Abeille, Site Agroparc, 84914, Avignon, France

² INRA, UMR 408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Site Agroparc, 84914, Avignon, France

³ Department of Chemistry, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, B.C. V5A 1S6, Canada

Frontiers in Zoology, Vol 7, Issue 1, 18, 2010

Abstract:

Background: In social insects, the queen is essential to the functioning and homeostasis of the colony. This influence has been demonstrated to be mediated through pheromone communication. However, the only social insect for which any queen pheromone has been identified is the honey bee (*Apis mellifera*) with its well-known queen mandibular pheromone (QMP). Although pleiotropic effects on colony regulation are accredited to the QMP, this pheromone does not trigger the full behavioral and physiological response observed in the presence of the queen, suggesting the presence of additional compounds. We tested the hypothesis of a pheromone redundancy in honey bee queens by comparing the influence of queens with and without mandibular glands on worker behavior and physiology.

Results: Demandibulated queens had no detectable (E)-9-oxodec-2-enoic acid (9-ODA), the major compound in QMP, yet they controlled worker behavior (cell construction and queen retinue) and physiology (ovary inhibition) as efficiently as intact queens.

Conclusions: We demonstrated that the queen uses other pheromones as powerful as QMP to control the colony. It follows that queens appear to have multiple active compounds with similar functions in the colony (pheromone redundancy). Our findings support two hypotheses in the biology of social insects: (1) that multiple semiochemicals with synonymous meaning exist in the honey bee, (2) that this extensive semiochemical vocabulary exists because it confers an evolutionary advantage to the colony.

Background

A remarkable trait of social insect colonies is the assemblage of individuals into a coherent social unit. Members of the society exhibit an organization mainly controlled by a complex pheromonal language (Bell, Cardé, 1984). Behavioral evidence for division of reproduction and labor in the colony indicates the importance of pheromones in both queen-worker and worker-worker interactions, including mediating the regulation of task allocation (Le Conte, Hefetz, 2008). In the case of honey bees, coordination of the different tasks is partly mediated by chemical signals (Le Conte, Hefetz, 2008). In social insects pheromones provide the colony with a rich syntax that is important for the spread of information and the integration of social behavior.

In honey bees, even though some workers can lay eggs, the queen produces most of the eggs and is the progenitor of several thousand bees in a colony. In addition she provides central information that regulates colony homeostasis, growth and reproduction (Winston, 1987). “Queen substance”, (E)-9-oxodec-2-enoic acid (9-ODA) is a queen pheromone produced in the mandibular glands and that was the first identified honey bee pheromone with functional roles in the colony (Barbier, Lederer, 1960). Later, in 1988 Slessor *et al.* discovered four other compounds from the mandibular glands that act synergistically with 9-ODA: both enantiomers of 9-hydroxydec-2-enoic acid (9-HDA), methyl p-hydroxybenzoate (HOB) and 4-hydroxy-3-methoxyphenylethanol (HVA). These five chemicals constitute QMP, which strongly attracts young workers and stimulates queen tending (feeding, licking and antennating the queen). When these young workers subsequently interact with other bees, the QMP is dispersed throughout the colony by antennation, cuticular contacts and trophallaxis between the workers (Naumann, 1991). In 2003, Keeling *et al.* discovered four other compounds that synergize with QMP for retinue behavior, in particular in bees that do not respond strongly to QMP with retinue behavior (Keeling *et al.*, 2003).

The other main function of QMP is the inhibition of worker ovary activation (Hoover *et al.*, 2003). Reproductive control is essential to colony stability and functionality since reproductive workers do not work as efficiently as normal worker bees (Dampney *et al.*, 2004). QMP also controls comb construction by stimulating quantitative and qualitative worker-sized cell construction (Ledoux *et al.*, 2001). It inhibits the construction of drone and queen cells (Winston *et al.*, 1989) until colony growth results in a less efficient QMP distribution (Winston *et al.*, 1991). New QMP functions are still being discovered; for example, besides mediating worker behavioral maturation (Pankiw *et al.*, 1998a), QMP also increases resistance to starvation (Fischer, Grozinger, 2008) and affects olfactory learning and memory (Vergoz *et al.*, 2007).

QMP is thus integrated into colony life as a powerful and central systemic regulator. However, QMP does not control the full gamut of behavioral and physiological responses that result from the presence of a queen. For example, Velthuis and Van Es (Velthuis, 1970b; Velthuis, Van Es, 1964), found that queens from which mandibular glands were removed still retained their regulatory functions. Their experiments demonstrated that the mandibular glands are not essential for inhibition of queen cell construction, retinue behavior and inhibition of worker ovary activation. However, it is not clear from their studies whether the

demandibulated queens triggered the full worker response that is triggered by intact queens. The effect of demandibulated queens on a colony was not directly compared to colonies headed by intact queens or to queenless colonies. The exception was worker ovary activation, which showed almost the same effect with intact as with demandibulated queens (Velthuis, 1970b). Consequently, other sources of queen pheromone have been proposed including tergal, tarsal and Dufour's glands (Le Conte, Hefetz, 2008; Slessor *et al.*, 2005a). A series of studies demonstrated that Dufour extracts attracted workers (Katzav-Gozansky *et al.*, 2001) and tergal glands affected both ovary activation and retinue behavior (Wossler, Crewe, 1999a; Wossler, Crewe, 1999b). However a queen has ca. 0.5µg (out of ca. 150-200 µg total) of 9-ODA on her cuticle surface (Naumann *et al.*, 1991) and previous studies did not check for the presence of QMP residues in Dufour and tergal gland extracts or in queens without mandibular glands (Katzav-Gozansky *et al.*, 2001; Wossler, Crewe, 1999a; Wossler, Crewe, 1999b). Without a control for QMP residue one could hypothesize that the effects of the different experiments on worker control could be due to those pheromone residues. Thus, the relative contribution of other queen chemicals besides QMP is not well understood and the following question remains unanswered: In addition to the well-known pheromone pleiotropy of the QMP, do queens also use different pheromones that converge on the same function (pheromone redundancy)?

To answer this question, we investigated the importance of additional queen pheromones by surgically removing the mandibular glands from virgin queens and checking for QMP residue on the queen bodies. We then asked whether demandibulated queens were as effective as normal queens in regulating ovary activation, comb construction and retinue behavior. A regulatory control as effective as a normal queen would demonstrate that additional queen chemicals might be as important as QMP in regulating colony functionality and thus support the hypothesis of pheromone redundancy.

Methods

Honey bee queen rearing

Experiments were performed in Avignon (France) in 2005, 2007 and 2009 with local colonies derived from populations of a mixture of European subspecies of *Apis mellifera* (*A. m. ligustica* and *A. m. mellifera*). Queen rearing was performed according to standard beekeeping

methods (Laidlaw, Page, 1997). One day before hatching, queen cells were removed from their hive and placed individually in cages in an incubator (34°C, 60% RH) with 10 day-old workers. They were fed *ad libitum* with water, candy (30% honey from the source colonies, 70% powdered sugar) and pollen. One-day-old bees were obtained from honey combs containing last-stage pupae removed from 3 source colonies. In each replicate, queens originated from the same colony to reduce genetic variation and thus potential pheromone variation (Pankiw *et al.*, 1996; Plettner *et al.*, 1997).

Dissection of mandibular glands

Mandibular gland excision was performed using a method modified from Gary (Gary, 1961a) when queens were one or two-days old, since mandibular glands do not secrete chemicals outside the body until 3 days after emergence (Nedel, 1960). Experimental queens were narcotized lightly with CO₂ (~15 seconds) and placed under a binocular magnifying glass (× 8), kept on the back between the thumb and forefinger in order to clear the head. Mandibles were carefully removed with scissors and forceps by cutting the articulation of the mandibles. An opening appeared on both sides of the mouth. Then, the mandibular glands were carefully extirpated from the queen heads with extra fine forceps. After surgery, the demandibulated queens (MG–) were returned to their own cage. One day later, the mandible incisions had healed. Control queens (MG+) were sham operated by the same procedure, except mandibular gland extirpation.

Pheromone analysis

The presence of queen mandibular pheromone components (9-ODA-HOB-HVA-9-HDA) in MG– (n = 17) and MG+ (n = 19) queens was analyzed at the end of the 2009 experiment. Queens were individually stored at -20°C for later chemical analysis of the QMP components. Head, thorax and abdomen were dissected and extracted separately in 200 µl of methanol and 100 µl of decanoic acid (250 ng/µl; internal standard). Preparations were cooled on ice, body parts were crushed with a glass rod for 2 minutes and centrifuged (2500 × g for 20 min. at 4°C). The supernatant was collected, the total volume of supernatant recorded and a sample (20 µl) was concentrated under a nitrogen stream and then derivatized with 5 µl of bistrimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA). The solution was agitated and left at room temperature for 40 min. The derivatized sample was then diluted in 100 µl of isohexane and 1 µl of this solution was injected into a fast gas chromatograph (Shimadzu 2014, Japan) equipped with a split-splitless inlet, a flame ionization detector, and a capillary column

(equity-5; 15m x 0.10mm, 0.10 μ m film thickness). The samples were injected in split mode. Hydrogen was used as the carrier gas with column flow of 0.52ml min⁻¹. The oven temperature was set at 100°C, then 100°C to 200°C at 40°C min⁻¹ and 200°C to 250°C at 10°C min⁻¹ and held at 250°C for 2 min. Standard solutions of each QMP compounds derivatized with BSTFA were used to calibrate the response of the instrument with respect to the internal standard. Identification and quantification of HOB, 9-ODA, HVA, 9-HDA were based on retention times of synthetic compounds (Sigma-Aldrich, France and PheroTech, Canada) and on the internal standard method. The confirmation of QMP compounds was done by a mass spectrometer (Shimadzu CP2010, Japan). The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV with continuous scans (every 0.2 sec) from a mass to charge ratio (m/z) of 70 to 400. Data were collected with GC-MS Solution software (Shimadzu, Japan). Compounds were identified by comparison with standards. The variation in QMP amount between the MG– and MG+ queens was statistically determined, compound by compound, using Mann–Whitney U tests (STATVIEW 5.0, SAS Institute, Cary, NC).

Experimental set up

The effect of MG– and MG+ queens on both ovary activation and comb construction was tested in cage experiments. Plastic cages (11 × 8.5 × 5.8cm) (Pain, 1966) were composed of 150 one day-old bees originating from 3 colonies and fed *ad libitum* with water, pollen (to promote ovary activation), and candy. They were kept in an incubator (33°C and 60% RH) during 15 days and were then collected for ovary activation analysis. Ovary activation generally reaches a peak at 14-15 days in cage (Velthuis, 1970a). A piece of wax (5 × 1cm) was stuck on the top of the cage as primer for comb cell construction. Three different groups were tested: cages with a normal queen (MG+: positive control), queenless cages (QL: negative control), and cages with a demandibulated queen (MG–). Since queens emit highly volatile chemicals (Gilley *et al.*, 2006), each group was separated in different incubators with the same environment.

Ovary activation

Twenty bees reared in QL or MG+ or MG– conditions were randomly collected from each cage for ovary activation analysis. They were dissected under a binocular microscope, and the level of ovary activation was classified into 5 stages according to Pernal and Currie (2000) as follows: stage 0: no follicle development, ovaries are slender and non-differentiated, referred to undeveloped ovaries, stage 1: slight enlargement, beginnings of differentiation; stage 2:

presence of distinct cells leading to swellings and constrictions, stage 3: egg volume exceeding that of the nutritive follicle, stage 4: presence of fully formed eggs, ovaries are characterized by having mature oocytes and referred to fully formed ovaries. The dissector was *blind* to the treatment identity of bees. One repetition (2009) was performed with 55 cages (MG–: n = 17, MG+: n = 19 and QL: n = 19). The MG–, MG+ and QL effects on worker ovary activation stage was determined using a Kruskal-Wallis ANOVA test followed by Mann–Whitney U post-hoc tests.

Comb construction

At day 15, the comb construction from each cage was collected and the number of cells counted. The mean diameter of 20 cells/cage/treatment was determined and divided into two categories according to their size, worker-sized cells' diameters being from 5 to 5.4mm and drone-sized cells from 6.2 to 6.4mm (Winston, 1987). In addition, the number of royal draft cells, which are conical and elongated, was counted in the different groups. Three repetitions (2005, 2007, and 2009) were performed giving a total of 125 cages (MG–: n = 53, MG+: n = 36 and QL: n = 36). Queen treatments effect on cell number and size were analyzed using a two-way ANOVA (repetitions and treatments) followed by Fisher post-hoc tests. The number of cells was transformed: $y' = \ln(y+1)$ to attain variance homogeneity in the 3 groups.

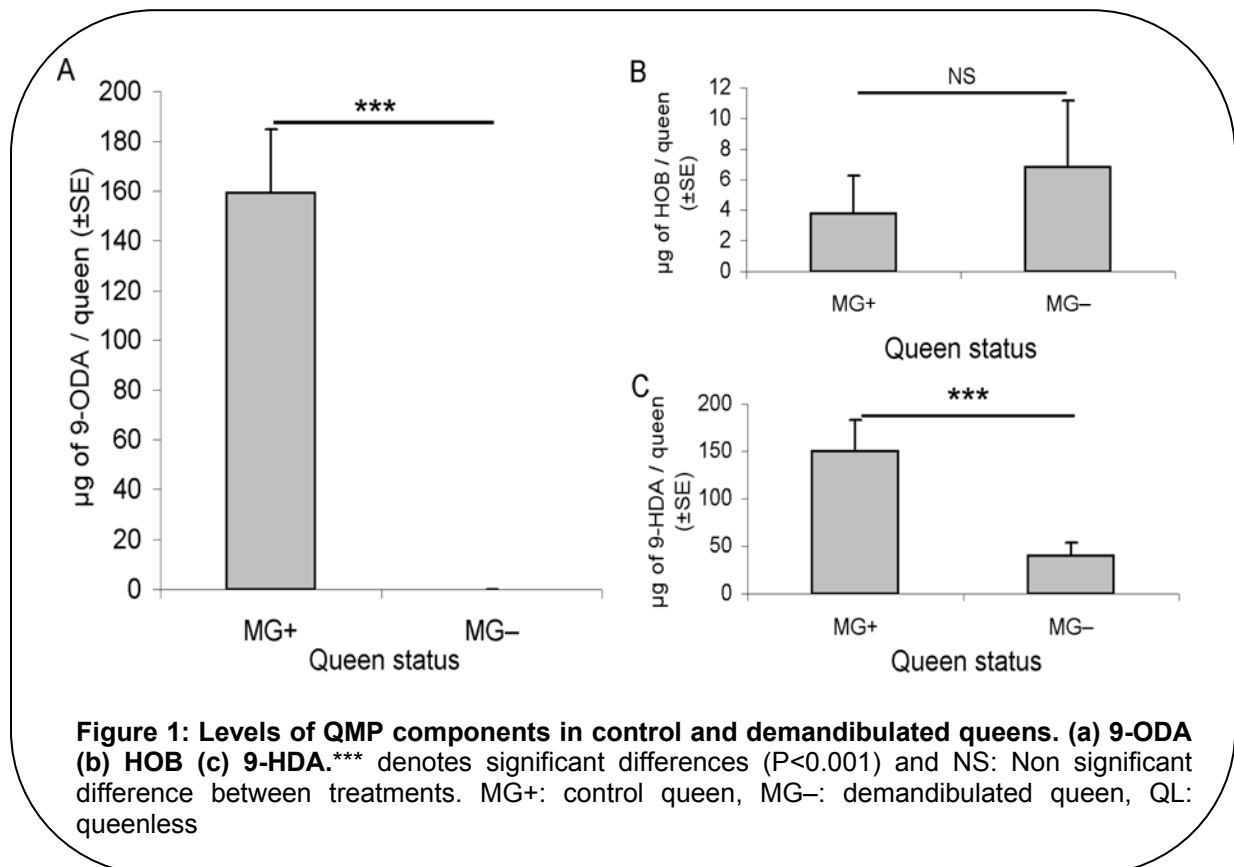
Retinue behavior

The effects of queens MG–, MG+ on retinue behavior were analyzed in two one-frame standardized observation hives containing 3,000 one day-old bees. For each repetition, one day-old bees were collected from the same hives. Each hive was established as similar as possible with one frame containing equivalent proportion of honey, pollen, brood and eggs. Hives were placed in an indoor apiary (25°C) and connected to the outside to allow normal foraging activity. The queens were not allowed to mate and introduced into the hive 20 days after hatching. Two days after queen introduction in the observation hives, a series of 5 pictures were taken twice. The number of workers surrounding the queen was determined and used to estimate retinue behavior. Then the queen was replaced randomly by a new queen MG– or MG+. One repetition (2009) was performed giving a total of 15 replicates for both MG– and MG+ queens. The number of bees performing the retinue behavior was compared by using a Mann–Whitney U test.

Results

Pheromone analysis

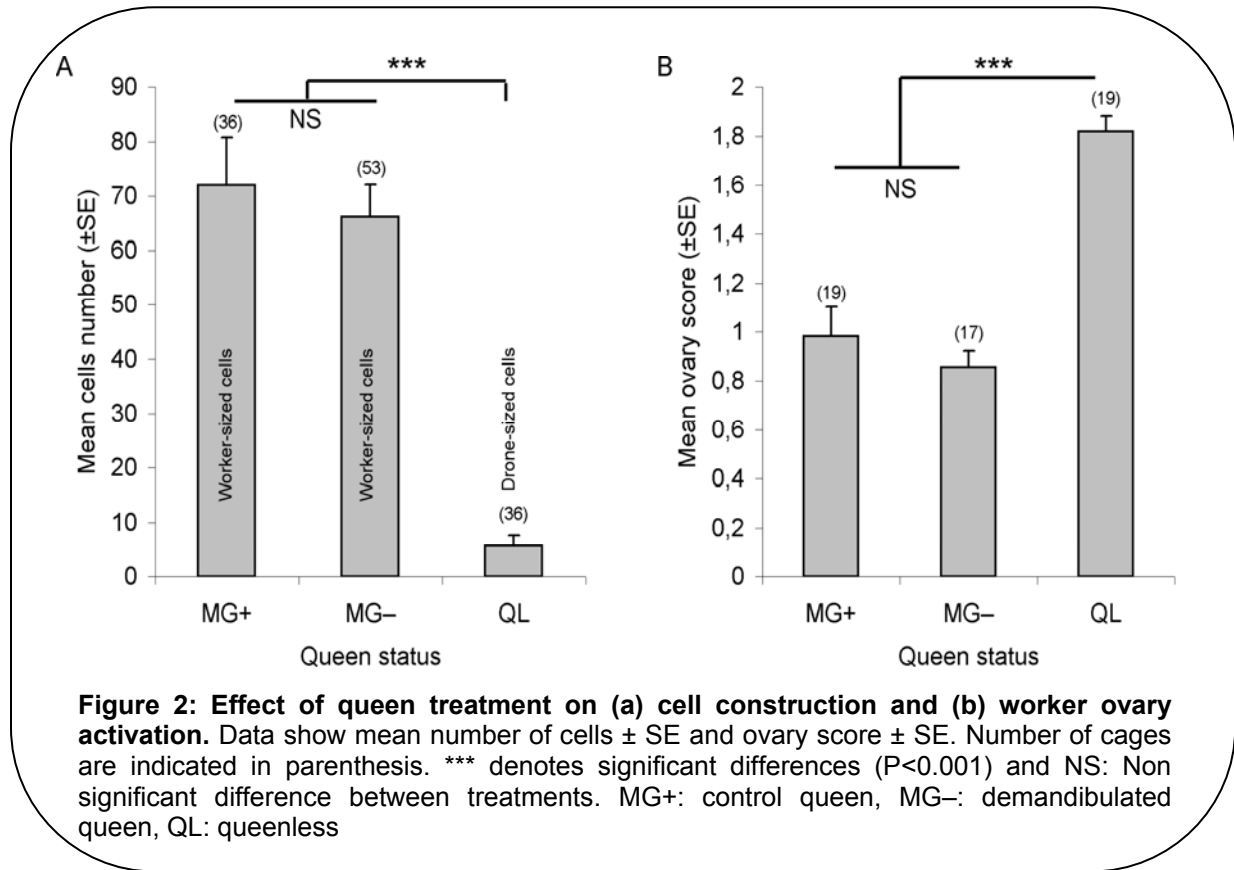
Normal amounts of 9-ODA ($159 \pm 26 \mu\text{g}$), HOB ($3.7 \pm 2.5 \mu\text{g}$) and 9-HDA ($150 \pm 34 \mu\text{g}$) were found in queen MG+ (Ledoux *et al.*, 2001). As found by Ledoux *et al.* (2001), HVA was not detected in virgin queens. Interestingly, quantities of 9-HDA ($39 \pm 14 \mu\text{g}$) and HOB ($7 \pm 4 \mu\text{g}$) were detected in queen MG–, 9-ODA was not detectable (minimum GC detection equal at 0.47 ng of 9-ODA / μL of isohexane) (Fig. 1). As a result, 9-ODA was only found in queen MG+ ($Z = -5.05$, $P < 0.0001$); 9-HDA was higher in quantity in queen MG+ compared to queen MG– ($Z = -3.5$, $P < 0.0005$) but there was no significant difference in the amount of HOB between the two queen types ($Z = -1.13$, $P = 0.25$).



Ovary activation

We found a significant treatment effect on worker ovary activation ($N = 1100$, $H = 102.1$, $df = 2$, $P < 0.0001$, fig. 2). Bees reared with queen MG+ or MG– had a significantly lower ovary activation compared to bees from QL cages (MG– vs. QL: $Z = -9.34$, $P < 0.0001$; MG+ vs. QL: $Z = -9.04$, $P < 0.0001$). However, despite differences in pheromone composition, the effect of queens MG+ and MG– on worker ovary activation did not differ significantly ($Z =$

–0.737, $P=0.5$). The percentage of workers in MG–, MG+ and QL cages, respectively, with no ovary activation (range 0-1) was 82%, 81% and 52%, and workers with ovary activation (range of 3-4) was 3%, 4% and 28%.



Comb construction

We found significant treatment and repetition effects on comb construction, but no interaction effect between the two factors (treatment: $F_{2,124}=121.8$, $P<0.0001$, repetition : $F_{2,124}=12.6$, $P<0.0001$, treatment x repetition : $F_{4,249}= 1.18$, $P=0.32$). The comb size (number of cells) significantly increased in the queen presence (MG+, MG–) compared to QL cages (MG+ vs. QL: $P<0.0001$, MG– vs. QL: $P<0.0001$), however no differences were detected between the two types of queen (MG+ vs. MG–: $P=0.68$, Fig. 2). The queen treatment also had an effect on the cell size ($F_{2,124}=130.8$, $P<0.0001$). This effect did not change between repetitions ($F_{2,124}=1.92$, $P=0.15$). Workers reared with MG+ and MG– queens built worker-sized cells that did not differ significantly in their diameters (5.13 ± 0.07 and 5.20 ± 0.06 mm, respectively; $P=0.94$) but QL workers built drone-sized cells that were larger (6.15 ± 0.08 mm; MG+ vs. QL: $P<0.0001$, MG– vs. QL: $P<0.0001$).

No royal cell construction was observed in our experimental set-up with either queens MG+ or MG-. However, QL workers constructed one to three royal draft cells per cage (1.3 ± 0.2).

Retinue behavior

The mean number of workers performing retinue behavior around queens MG- and MG+ reached 10.3 ± 0.5 and 10.7 ± 0.2 , respectively and was not significantly different ($Z = -0.38$, $P = 0.7$).

Discussion

Previous investigations found that pheromones from mandibular glands have a pronounced effect on colony life (Slessor *et al.*, 2005a). Due to QMP importance, it was expected, that queens from whom mandibular glands were removed would be less effective in regulating worker responses. Our results do not support this hypothesis but show that demandibulated queens retain their full regulatory functions (Table 1), highlighting some redundancy in queen control. Our results are in accordance with the studies of Velthuis and Van Es (Velthuis, 1970b; Velthuis, Van Es, 1964), suggesting that QMP is not responsible by itself for the queen's pheromonal regulation of colony function (worker ovary activation, queen cell construction and retinue behaviour). This phenomenon can now be extended to the regulation of general comb construction (cell number and type) (this paper). In addition, by checking for the first time the effect of mandibular gland removal on the composition of 9-ODA, 9-HDA and HOB, we showed that demandibulated virgin queens were as effective as normal virgin queens in regulating colony function.

Table 1: Comparative effect of queenless (QL), control queen (MG+), and extirpated queen (MG-) on worker behavior and physiology.

	MG+	MG-	QL
Worker ovary inhibition	+	+	-
Retinue behavior	+	+	Ø
Cells construction	+	+	-
Cells type	♀	♀	♂
Queen cells inhibition	+	+	-

(♀ worker cells construction, ♂ drone cells construction, Ø not available, + positive, - negative)

Consistent with previous studies, (Pankiw *et al.*, 1996; Slessor *et al.*, 1990) sham-operated queens (MG+) had normal levels of QMP. Moreover in this study, queens from whom mandibular glands had been removed (MG-) had a similar levels of HOB, lower levels of 9-

HDA and no detectable 9-ODA. This confirms that 9-ODA is uniquely produced and stored in the queen mandibular glands (Naumann *et al.*, 1991) and suggests the existence of another source of production of HOB and 9-HDA as found by Whiffler and Hepburn (1991) in *A. m. capensis* and *A. m. scutellata* queens.

Queens produce a blend of 9 compounds (Queen Retinue Pheromone, QRP) that, in concert, elicit almost the full queen retinue behavior from honey bee workers. Pure 9-ODA can elicit weak queen retinue behavior, whereas the other compounds act synergistically with 9-ODA and do not elicit a retinue response by themselves (Keeling *et al.*, 2003; Slessor *et al.*, 1988). This pheromone blend is composed of QMP, coniferyl alcohol produced in the mandibular glands and 3 other compounds, methyl oleate, hexadecan-1-ol and linolenic acid, produced in the body of the queen (Keeling *et al.*, 2003). Contrary to our expectation, and despite no 9-ODA detectable, MG– queens had a similar number of workers performing retinue behavior (around 10) compared to the sham-operated control queens (between 8 to 12 workers (Free, 1987; Winston, 1987)). Therefore, as methyl oleate, hexadecan 1-ol and the linolenic acid are not produced in the mandibular gland (Keeling *et al.*, 2003) and 9-HDA and HOB are found in MG– queens, those compounds might play a role together or with other, as yet non-identified, components in eliciting retinue behavior.

Our results confirm that the two types of virgin queen, MG– and MG+, partially inhibit ovary activation in workers. Thus, other queen-produced substances have the potential to substitute for 9-ODA. Recently, a volatile compound, E- β -ocimene, was found to be produced by mated queens (Gilley *et al.*, 2006) and larval brood (Maisonnasse *et al.*, 2009), and this compound has been found to inhibit ovary activation in workers (Maisonnasse *et al.*, 2009). But E- β -ocimene was not found in 3 day-old virgin queens (Gilley *et al.*, 2006). In our experiment virgin queens were 5 to 20 days old, thus complementary experiments are needed to know if virgin queens older than 3 days could produce this compound or if mating is required to increase the production of this compound, as is the case for HVA (Pankiw *et al.*, 1996). Furthermore, virgin and mated queens produce esters (Keeling, Slessor, 2005), such as ethyl palmitate (EP), which have the potential to suppress ovary activation in workers (Mohammedi *et al.*, 1998). EP works efficiently at 5400 ng per bee and the queen produces only 330 ng of EP, thus EP emission by the queen could act in addition to larval EP production or other queen chemicals but is unlikely to act alone in mediating ovary inhibition. Tergal gland extracts can also partially regulate ovary activation in workers (Wossler, Crewe, 1999a), but

the presence of 9-ODA on the queen's cuticle (Naumann, 1991) might be involved. In addition, the effect of 9-HDA and HOB together or separately was not tested on worker ovaries, however their inhibitory action in the QMP blend has been documented. It is possible that E- β -ocimene, ethyl palmitate, compounds from tergal glands, HOB and 9-HDA act in synergy to provide a full worker response similar to normal queens.

Interestingly, workers with a MG– queen produced worker-sized cells, and built a large number of cells, as in the MG+ queen condition, in contrast to the QL condition in which workers constructed a small number of cells that were drone-sized. Thus, our results indicate that comb construction is also regulated by queen chemicals other than QMP (Ledoux *et al.*, 2001). In the absence of the queen, *A. m. capensis* workers, who reproduce via thelytokous parthenogenesis and *A. m. scutellata*, who reproduce via arrhenotokous parthenogenesis build only worker or drone cells, respectively, but queenless hybrid colonies produce both cell types or only worker cells (Neumann *et al.*, 2000). This would support the idea that comb construction can be regulated by chemicals other than QMP that are also produced by the workers. However, since *A. m. capensis* workers develop QMP-profiles with a high amount of 9-ODA (Simon *et al.*, 2001), the construction of worker cells in those queenless colonies could also be due to the QMP.

This study used virgin queens, however mating in honey bee queens causes dramatic changes in queen behavior and physiology (Kocher *et al.*, 2008). For example, the queen pheromone blend is modulated by the reproductive status of the queens. Virgin and newly mated queens produce the same QMP signal (Kocher *et al.*, 2009) while a different QMP blend is produced by the mature mated queen (Pankiw *et al.*, 1996). Therefore, whether demandibulated mated queens keep their regulatory functions, like virgin MG– queens, remains to be tested.

The evidence for multiple, active queen compounds with similar effects raises the question of why such redundancy? An answer to this question may be found in the theoretical analysis of communication in social insects. Two opposing theories can potentially explain the evolution of pheromone communication between the queen and workers. On one hand it is believed that the queen pheromone acts as a reliable and honest signal, to which workers respond by restraining themselves from reproducing in order to increase their inclusive fitness, but on the other hand, queen pheromones could be used to control and manipulate worker reproduction. (Heinze, d'Ettorre, 2009; Keller, Nonacs, 1993) This dishonest control over reproduction by

the queen would be evolutionarily unstable, because workers would be selected to overcome her inhibitory effect. As a consequence, workers would be selected for a reduced sensitivity to specific queen chemicals, to which the queen would develop an alternative pheromone source. In that case, queen pheromone would evolve towards a multi-component blend, as opposed to a relatively simple, honest single-component signal (Heinze, d'Ettorre, 2009; Keller, Nonacs, 1993). The redundancy of multiple, active queen compounds might be the result of competition between queens and workers over reproduction (Katzav-Gozansky, 2006; Katzav-Gozansky *et al.*, 2004; Strauss *et al.*, 2008). Differences in sensitivity to QMP between colonies (Pankiw *et al.*, 1994) and evidence of workers being able to lay eggs that can survive, despite the inhibitory presence of a queen (Martin *et al.*, 2002; Oldroyd *et al.*, 1994), are both found in nature. This shows that workers have the capacity to bypass queen pheromonal control of reproduction. Since, *A. m. capensis* parasitic workers, who reproduce despite the presence of a queen, develop a QMP-profile (Dietemann *et al.*, 2007; Dietemann *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2001) to compete pheromonally with the host queen or workers, it would be interesting to determine whether they have also developed multiple, redundant queen chemicals other than QMP-like.

A second and alternative explanation to the pheromone redundancy hypothesis would be that the presence of multiple queen pheromones might fine-tune the regulation of colony homeostasis. The different queen chemicals may have redundant functions, but their efficiency may differ and depend on the context, their transmission (Slessor *et al.*, 2005a) and the variability in their production. In summary, each chemical may not be effective by itself, but altogether, they enable the queen to develop a complex and precise chemical “syntax” during the colony life-cycle. In addition, worker behavior and physiology is regulated by multiple hormone signaling pathways (e.g. juvenile hormone, vitellogenin, insulin) (Ament *et al.*, 2008; Bloch *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 2007), so it is possible that the different but redundant queen chemicals each act on different targets of the worker hormonal system.

Conclusion

Queen-worker communication is essential to colony homeostasis. For the past 20 years, 9-ODA, and consequently QMP, were described as the main regulatory system of worker behavior and physiology. Now, our results demonstrate that other queen chemicals as powerful as 9-ODA and QMP are involved in worker regulation. Now the next challenge is to

find the secondary queen pheromonal system and test for its effects on the hormonal system. In honey bees, pheromone signaling systems have pleiotropic effects as regulators of colony functionality. The signal redundancy originating from the same individual now adds another level of complexity to the already intricate language of the colony.

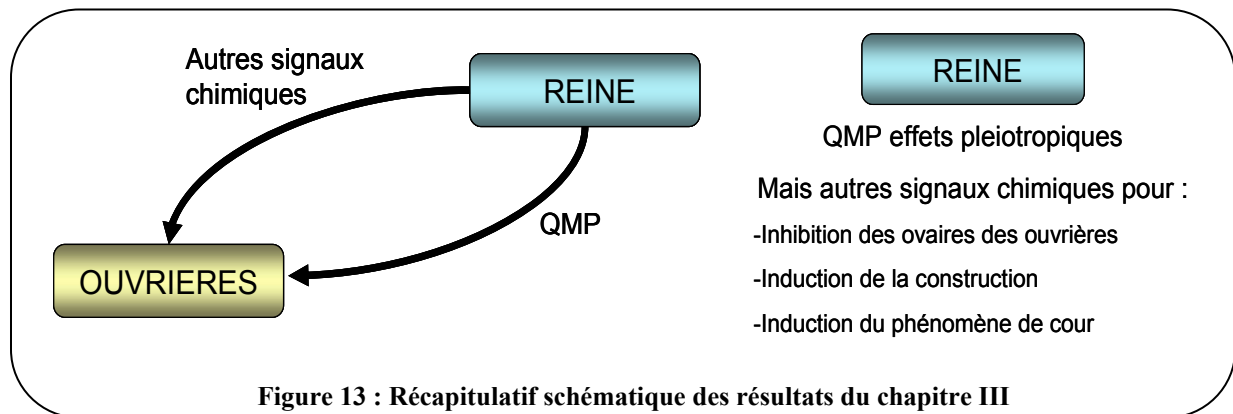
Acknowledgements

We thank Horyia Amaach, Geoffrey Montes and Thomas† and Martin Le Conte, for their laboratory and field assistance, Axel Brockmann, Marion Ellis, Cynthia McDonnell and three anonymous referees for comments and English editing that improved the manuscript. Funds were provided by Human Frontier Science Program (RGP0042/2007-C101) for AM, YLC and EP laboratory research and CA was supported by an INRA young researcher position (INRA SPE department).

Transition :

La reine utilise plusieurs phéromones pour réguler la colonie (Fig. 13). La QMP est une phéromone majeure mais d'autres phéromones royales existent. Malgré ces actions pleiotropiques, la QMP peut être substituée par d'autres phéromones pour l'inhibition des ovaires des ouvrières, le phénomène de cour et la construction de cire dans la colonie. Une redondance phéromonale existe dans la communication phéromonale de la reine.

Chez le couvain, une phéromone a des effets pleiotropiques sur les ouvrières : la BEP. Comme l'indiquent les résultats précédents, il est possible que d'autres phéromones soient émises par le couvain en addition de la BEP. Les deux articles suivants décrivent si le couvain émet des phéromones volatiles avec des effets redondants de la BEP mais pouvant atteindre tous les individus de la colonie.



**Chapitre IV Identification d'une nouvelle phéromone larvaire : le
E- β -ocimène, et ses effets dans les régulations sociales de la
colonie.**

Chapitre IV Identification d'une nouvelle phéromone larvaire : le E- β -ocimène, et ses effets dans les régulations sociales de la colonie.

Avant propos :

Chez l'abeille, insecte eusocial, chaque ouvrière au cours de sa maturation comportementale prend soin du couvain (Winston, 1987). Le couvain est un stade de développement particulier renouvelant les individus de la colonie, sans couvain la colonie dépérit. Le couvain envoie des signaux chimiques à la colonie pour qu'elle s'adapte à lui et lui procure les soins nécessaires à son développement. Par exemple, le couvain a besoin d'être thermorégulé par les ouvrières à une température de 34°C pour se développer. Les besoins en nourriture sont assurés par les nourrices qui produisent de la gelée royale et de la bouillie larvaire secrétées par leurs glandes hypopharyngiennes et mandibulaires. Le couvain envoie des signaux aux ouvrières, et notamment la BEP dont les effets sont pléiotropiques sur les ouvrières (Le Conte *et al.*, 2001; Slessor *et al.*, 2005a).

Cette phéromone est composée de molécules avec une faible volatilité et sera transmise aux ouvrières en contact ou à proximité des larves. En outre, la BEP n'a qu'un effet partiel sur la reproduction des ouvrières. D'autres phéromones, plus volatiles, émises par le couvain, pourraient intervenir dans la communication couvain-nourrices. Elles permettraient une diffusion du signal dans toute la colonie avec un spectre d'action plus large sur les nourrices mais aussi sur les MAB. Nous nous sommes intéressés à l'existence potentielle de phéromones larvaires volatiles qui puisse avoir un effet sur l'inhibition des ovaires, le développement des glandes hypopharyngiennes et la régulation de la division du travail des ouvrières.

Ce chapitre est scindé en deux articles, le premier traite de l'identification du E- β -ocimène, et de son effet sur la reproduction des ouvrières, le second de la dynamique de production de cette phéromone chez les différents stades de développement du couvain et de ses effets sur la colonie (division du travail) et sur les nourrices (développement des glandes hypopharyngiennes).

A Scientific Note on E- β -ocimene, a New Volatile Primer Pheromone that Inhibits Worker Ovary Development in Honey Bees

Résumé :

En l'absence de toute contrainte de l'environnement phéromonal, les ouvrières deviennent des individus reproducteurs et pondent des œufs non fécondés (mâle, haploïde) ce qui modifie la colonie et le soin au couvain. Le couvain émet la BEP qui inhibe partiellement l'activation du développement des ovaires des ouvrières. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à isoler et identifier des molécules volatiles émises par le couvain et à décrire leurs éventuelles actions phéromonales sur l'inhibition des ovaires des ouvrières. La technique de la Micro Extraction sur phase Solide (SPME) a été utilisée pour piéger les molécules émises par les stades larvaires du couvain. Après analyse en chromatographie en phase gazeuse des différents échantillons, les chromatogrammes ont révélé différents pics. Mais un seul composé majeur a été trouvé dans tous les échantillons : le E- β -ocimène (3(E)-3,7-diméthyl-1,3,6-octatriène) identifié par GC-MS (Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de masse) avec un standard de référence. Nous avons ensuite testé l'effet du E- β -ocimène sur le développement des ovaires de 100 ouvrières en cagette. Après analyse des ovaires des ouvrières, nous avons montré que le E- β -ocimène inhibe partiellement l'activation des ovaires des ouvrières.

En émettant le E- β -ocimène, les larves dirigent l'allocation d'énergie des ouvrières (plus précisément des nourrices) pour l'exécution des tâches de la colonie plutôt que dans la production d'œufs. Le E- β -ocimène est également produit par la reine. À ce jour, les études montrent que la régulation des ovaires des ouvrières est contrôlée par trois phéromones différentes, l'une très volatile : le E- β -ocimène et deux faiblement volatiles la BEP et la QMP, émises par deux acteurs de la colonie : les larves et la reine.

A Scientific Note on E- β -ocimene, a New Volatile Primer Pheromone that Inhibits Worker Ovary Development in Honey Bees

Alban Maisonnasse¹, Jean-Christophe Lenoir¹, Guy Costagliola², Dominique Beslay¹, Fanny Choteau³, Didier Crauser¹, Jean-Marc Becard¹, Erika Plettner⁵ and Yves Le Conte¹

¹ INRA, UMR 406, Abeilles et Environnement, Laboratoire Biologie et Protection de l'Abeille, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

² INRA, Unité Plantes et Systèmes de culture Horticoles, Site Agroparc, 84914 Avignon, France

³ Laboratoire de Chimie Bioorganique et des Systèmes Moléculaires Vectoriels, Université d'Avignon et des pays du Vaucluse, 33 rue du Pasteur, 84000 Avignon

⁴ Department of Chemistry, Simon Fraser University, 8888 University Drive, Burnaby, B.C. V5A 1S6, Canada

Key words: E- β -ocimene, ovary development, pheromone, brood, *Apis mellifera*

Apidologie, Vol 40, Issue 5, 562-564, 2009

In social insects, larvae are completely dependent on adults to complete their development. In honey bees (*Apis mellifera* L.), larval development requires that larvae engage workers in nursing tasks rather than allocating energy in other activities (Le Conte, Hefetz, 2008). Indeed, in the absence of any constraint, workers tend to become active reproductive individual. The queen inhibits worker ovary development via pheromones (Hoover *et al.*, 2003; Wossler, Crewe, 1999a), but the inhibition of worker ovary development seems superior when bees are exposed to unsealed brood (Kropacova, Haslbachova, 1970; Kropacova, Haslbachova, 1971). Components of the brood pheromone have already been identified and consist of a blend of 10 esters (Le Conte *et al.*, 1990; Le Conte *et al.*, 1989). Two of these low volatility compounds have been demonstrated to partially decrease worker ovary development (Mohammedi *et al.*, 1998; Pankiw, Garza, 2007). Thus, we asked whether brood emits volatile compounds that could also have an effect on worker ovary activation. We identified a new highly volatile molecule from the larvae E- β -ocimene, that inhibits worker ovary maturation.

We used Solid Phase Microextraction (SPME) (65 μ m Carbowax) to sample volatiles emitted by different larval instars. We analyzed 20 larvae at stage 1, 2-3 or 10 larvae at stage 4-5. Larvae were kept in a 15 ml closed vial for 20 min in an incubator at 34°C and 50% humidity (N = 8, 10 and 7 biological replicates, respectively) during the sampling. Afterward, the fiber was desorbed into a gas chromatograph (Varian-Chrompack CP-Sil 8 CB-MS 30 m x 0.25 mm column with the following parameters : column temperature 40°C for 2 min, then 40°C to 200°C at 30°Cmin⁻¹, and 200°C to 320°C at 10°C.min⁻¹). Chromatograms showed different peaks but the only major compound found in all samples was E- β -ocimene (3(E)-3,7-dimethyl-1,3,6-octatriene identified by GC-MS and confirmed by a chemical standard). We determined that one larva produces in 20 minutes 2.84, 12.4 and 0.40 ng of E- β -ocimene at stage 1, 2-3 and 4-5, respectively (Fig. 1A) This compound is thus emitted in a significantly higher quantity by 2-3 larval instars compared to first and final instars (Kruskal-Wallis ANOVA test, N = 25, χ^2 = 18.99, *df* = 2, P < 0.001; stage 1 vs. 2-3: Mann-Whitney U post-hoc test, Z = -3.4208, P < 0.001 and stage 2-3 vs. 4-5: Z = 3.4157, P < 0.001). Older larvae have a lower level of E- β -ocimene production than first instars larvae (Z = 3.2404, P = 0.0012) despite being from 225 to 400 times bigger (Jay, 1963). A test in natural condition was done and E- β -ocimene was also found on larvae kept on their cells.

We then tested whether E- β -ocimene produced by larval instars 2-3 inhibits worker ovary development. Groups of 100 bees obtained from a mix of 3 colonies were tested. Bees were kept in Pain cages (11x8.5x5.8 cm) (Pain, 1966) from emergence until 15 days of age. Due to its high volatility and in order to avoid saturation of E- β -ocimene in cages, we mixed the molecule with paraffin oil and verified with SPME that a 10 larvae equivalent/caged bee of E- β -ocimene slowly dissipated over 24 hours (ie. 900 ug of E- β -ocimene/cage/24 hours). So, in each cage we then created an environment of 1000 larvae equivalent of E- β -ocimene. The E- β -ocimene and paraffin mix was placed in a wire screen-covered petri-dish at the bottom of the cage so that the bees could never be in direct contact with the pheromone. Caged workers were kept at 34°C in the dark and fed with a honey-sucrose candy, fresh pollen and water *ad libitum*. We performed 10 replicates for treatment and 9 per control (paraffin only). We used two identical incubators, one for treatment cages and one for control cages, to prevent E- β -ocimene dispersion. For each cage, 20 bees were randomly chosen, dissected, and the level of ovary development was determined using the 5 point scale ovary classification of Pernal and Currie (2000). Ovaries were classified as following: stage 0: no follicle development, stage 1: slight enlargement, stage 2: presence of distinct cells leading to swellings and constrictions, stage 3 egg volume exceeding that of the nutritive follicle, stage 4: presence of fully formed eggs.

E- β -ocimene treatment significantly inhibited worker ovary development compared to workers exposed to untreated paraffin control (Fig. 1B. Mann-Whitney U test on the mean score of each cage, N = 19, Z = -2.168, P = 0.0301). The results support our hypothesis that this compound acts as a volatile primer pheromone on workers by inhibiting maturation of their ovaries.

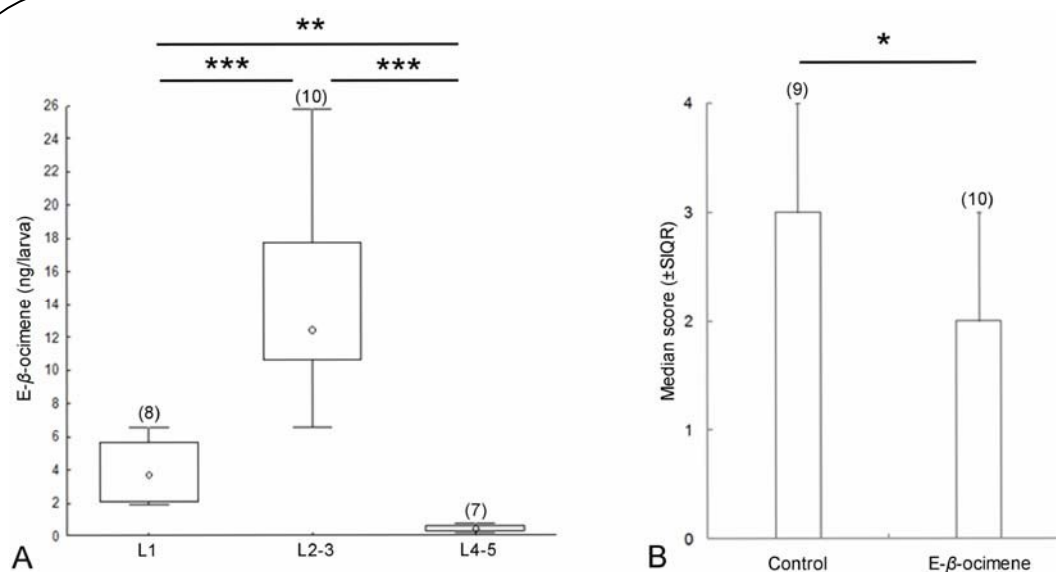


Figure 1A: E-β-ocimene production by different larval instars during 20 minutes using an external standard method of quantification. (ng/larvae) (circle: median; box: 25%-75%; whisker: Min-Max).

Figure 1B: Level of ovary development in response to 10 larval equivalents per bee of E-β-ocimene (9 μg of E-β-ocimene/bee/24 hrs) (median ± Semi-InterQuartile Range). (number of sampled groups in brackets)

By emitting E-β-ocimene, larvae may prevent workers (more precisely nurses) from allocating resources into egg production but rather take care of them. This compound also has been detected in mated honey bee queens (Gilley *et al.*, 2006), and was present in lower amounts in queens who were rejected within the first week of their introduction into queenless colonies (DeGrandi-Hoffman *et al.*, 2007). Queen-produced E-β-ocimene may then play a role in her ability to regulate worker ovary development, and thus, help her to monopolize egg-laying. Further studies should be done to test for synergistic effects between E-β-ocimene, brood and queen pheromones on worker ovary activation. Another important question to disentangle would be to understand the variation in the production of E-β-ocimene observed in successive larval instars. One could hypothesize that E-β-ocimene also acts as a hunger signal during starvation stress. Young larvae which produce more E-β-ocimene than older larvae could have a higher need of food.

Acknowledgments

We thank Thomas and Martin Le Conte, for their technical help and Marion Ellis that reviewed the English of our text. This work was supported by Famille Mary funds and Human Frontier Science Program (RGP0042/2007-C101).

Transition :

Le E- β -ocimène et les deux esters de la BEP, l'éthyle palmitate et le méthyle linolénate, forment un ensemble de 3 composés produits par les larves, qui inhibent partiellement le développement des ovaires des ouvrières. Mais le E- β -ocimène possède-t-il d'autres effets dans la colonie ? Chez les abeilles, les phéromones peuvent avoir des effets pleiotropiques comme par exemple la QMP, qui possède des effets modificateurs et incitateurs dans la colonie. Le E- β -ocimène, par sa volatilité, est dispersé dans toute la colonie, à tous les individus et à toutes les castes, y compris les MAB, caste qui comprend des abeilles du nid ne dispensant plus de soin au couvain.

Dans l'article suivant, nous avons voulu connaître la dynamique de production de cette nouvelle phéromone chez les différents stades larvaires : du stade 1 juste après l'éclosion, jusqu'au stade nymphe aux yeux noirs, qui précède la naissance des abeilles. Ensuite nous avons étudié l'effet de cette phéromone sur les ouvrières, et sa possible action sur le développement des glandes hypopharyngiennes des ouvrières et sur la division du travail.

E- β -ocimene, a Volatile Brood Pheromone Involved in Social Regulation in the Honey Bee Colony (*Apis mellifera*)

Résumé :

Le couvain est dépendant des ouvrières, sans les ouvrières, le couvain dépérit. Les ouvrières doivent être en mesure de reconnaître le couvain, son âge, sa caste, ses besoins pour pouvoir s'en occuper. On sait que les larves communiquent et manipulent les ouvrières pour optimiser leurs développements. La BEP produite principalement par les larves âgées (stade L4, L5) agit comme une phéromone de contact et permet au couvain de manipuler spécifiquement les nourrices. Après la découverte d'une phéromone volatile, le E- β -ocimène, émise par le couvain pour inhiber l'activation des ovaires des ouvrières, nous avons voulu étudier plus en détail cette phéromone. Sa production par les différents stades larvaires a été analysée et comparée à la production de la BEP. Nous avons tenté de caractériser ses effets possibles sur les nourrices (effets sur les glandes hypopharyngiennes) ou sur la colonie entière (action sur le développement comportemental des abeilles).

Nous avons montré que les jeunes larves (stade L1-3) produisent la plus grande quantité de E- β -ocimène en comparaison des autres stades larvaires et que l'E- β -ocimène accélère la maturation comportementale des abeilles. Nous n'avons pas trouvé d'effet du E- β -ocimène sur le développement des glandes hypopharyngiennes des ouvrières.

La production de E- β -ocimène est différente de la production de la BEP, les jeunes larves produisent de forts taux de E- β -ocimène et de faibles quantités de BEP, et inversement les larves âgées produisent de forts taux de BEP et de faibles quantités de E- β -ocimène. Les jeunes larves induisent une accélération du développement comportemental des abeilles, à l'inverse des larves âgées. De cette façon, les jeunes larves sont en mesure d'attribuer la priorité à la recherche de nourriture, en vue d'augmenter les réserves de la colonie pour leur nutrition et leur développement. Par contre, comme l'inhibition des ovaires des ouvrières est à la base du fonctionnement de la colonie, les deux phéromones agissent de la même manière en réduisant l'activation des ovaires des ouvrières.

L'émission de différentes phéromones par les larves fournit une syntaxe particulière aux ouvrières qui, en retour, ajustent leurs différents travaux pour le bon fonctionnement de la colonie.

**E- β -ocimene, a Volatile Brood Pheromone Involved in Social Regulation in the
Honey Bee Colony (*Apis mellifera*)**

Alban Maisonnasse¹, Jean-Christophe Lenoir¹, Dominique Beslay¹, Didier Crauser¹, Yves Le Conte¹.

¹ INRA, UMR 406, Abeilles et Environnement, Laboratoire Biologie et Protection de l'Abeille, Avignon, France.

Key words: *Apis mellifera*, E- β -ocimene, nurse, larvae, pheromone, social regulation

PLoS ONE, Vol 5, Issue 10, e13531, 2010

Abstract:

Background: In honey bee colony, the brood is able to manipulate and chemically control the workers in order to sustain their own development. A brood ester pheromone produced primarily by old larvae (4 and 5 days old larvae) was first identified as acting as a contact pheromone with specific effects on nurses in the colony. More recently a new volatile brood pheromone has been identified: E- β -ocimene, which partially inhibits ovary development in workers.

Methodology and Principal Finding: Our analysis of E- β -ocimene production revealed that young brood (newly hatched to 3 days old) produce the highest quantity of E- β -ocimene relative to their body weight. By testing the potential action of this molecule as a non-specific larval signal, due to its high volatility in the colony, we demonstrated that in the presence of E- β -ocimene nest workers start to forage earlier in life, as seen in the presence of real brood.

Conclusions/Significance: In this way, young larvae are able to assign precedence to the task of foraging by workers in order to increase food stores for their own development. Thus, in the complexity of honey bee chemical communication, E- β -ocimene, a pheromone of young larvae, provides the brood with the means to express their nutritional needs to the workers.

Key words: *Apis mellifera*, E- β -ocimene, nurse, larvae, pheromone, social regulation

Introduction

In eusocial insects, the brood is completely dependent on the care provided by the nurses. A lack of workers and especially nurse care lead to brood decline and death (VanEngelsdorp *et al.*, 2009). Thus, larval needs for food or warmth, as well as their age, need to be recognized by nurses, while the workers have to allocate energy to fulfil these needs.

In the honey bee *Apis mellifera*, there is evidence for a complex system of chemicals produced by the larvae to adjust the behaviour and the physiology of workers to the needs of the brood (Free, Winder, 1983; Huang, Otis, 1991; Koeniger, Abelsfelder, 1985; Slessor *et al.*, 2005a). Brood pheromones with primer and releaser effects on workers have been

identified (Le Conte, Hefetz, 2008; Slessor *et al.*, 2005a). One pheromone named brood ester pheromone (BEP), is composed of a blend of 10 methyl and ethyl esters (Le Conte *et al.*, 1990). This pheromone, modulates the feeding and pollen foraging behaviour of workers (Le Conte *et al.*, 1995a; Pankiw, 2007; Pankiw *et al.*, 1998b), inhibits the activation of the worker ovary (Arnold *et al.*, 1994; Mohammedi *et al.*, 1998; Pankiw, Garza, 2007), induces workers to cap brood cells (Le Conte *et al.*, 1990) and increases the rate of protein production in the hypopharyngeal glands of workers (Mohammedi *et al.*, 1996; Peters *et al.*, 2010). In addition, BEP modulates the behavioural maturation of honey bee workers (Le Conte *et al.*, 2001), then inducing workers to take care of the brood rather than allocating energy to outside activities. Due to the relatively low volatility of the esters, this larval signal can be assimilated as a contact pheromone that targets nurse workers directly involved in feeding the larvae.

Recently, we identified another brood pheromone component, E- β -ocimene, acting as a primer pheromone by inhibiting maturation of workers ovaries (Maisonasse *et al.*, 2009). This highly volatile molecule emitted by the brood is easily dispersed within the colony. Subsequently all workers on the nest can be in direct contact with this signal, such as the nurse (young bee), but also the middle-aged bees, from ages 12–21 days, that specialize on nectar processing and nest maintenance but show no interest in brood care (Johnson, 2010). Thus we hypothesize that E- β -ocimene could act as a signal targeting the different worker castes and could induce changes in colony-wide social regulation complementarily to BEP.

Here, we studied the emission of E- β -ocimene and its effects on worker physiology and behaviour to test if this brood pheromone acts as a signal in the social regulation of workers.

The E- β -ocimene emission was measured for all immature instars (larvae to pupae) to supplement previous data from Maisonasse *et al.* (2009). Before the analyses each individual was weighed in order to calculate the E- β -ocimene emission per mg of weight. Then we compared immature E- β -ocimene production to previously published BEP immature emission (Trouiller *et al.*, 1991) in order to determine if the two pheromone profiles overlap during immature development.

We also studied the action of E- β -ocimene on nurses. Nurses secrete 60 to 80% of the brood diet from their developed hypopharyngeal glands, providing a secretion rich in protein for young larvae (Winston, 1987). The larvae can stimulate the development of these glands in

nurses in order to consume a diet richer in protein (Huang, Otis, 1989). We investigated whether E- β -ocimene could mediate an increase in the size and protein production of the hypopharyngeal glands of nurses, like that seen with BEP, for produce a food richer in protein that would assure better development of larvae.

Finally, we analysed the global action of E- β -ocimene in social regulation. In particular, the brood can modify the division of labour of workers, by accelerating the behavioral development of workers, inducing worker nest bees to become foragers earlier in life (Amdam *et al.*, 2009; Le Conte *et al.*, 2001; Tsuruda, Page, 2009). In addition, the larvae manipulate the ratio of worker nest bees to foragers to increase their individual fitness. The volatility of E- β -ocimene allows for a distribution of pheromone to the nurse bees as well as to middle-aged bees. Thus we tested if larvae, by emitting E- β -ocimene, could modify behavioural maturation of workers.

Materials and Methods

E- β -ocimene quantification in immature honey bees

E- β -ocimene emitted by different larval and pupal instars was sampled by solid phase microextraction. A 65 μ m Carbowax was used as in a previous study (Maisonnette *et al.*, 2009) to identify E- β -ocimene. No peak co-elution occurs with this fiber. The analyses were done on three different hives (*Apis mellifera* sp.) from an apiary controlled with standard maintenance procedure. After removing a frame from the hive, larvae and pupae were cautiously picked and delicately enclosed in 15mL glass vials. Each sample was weighed before analysis to assess the mean weight of larvae and pupae. Aerial emissions were analyzed for groups of 20 larvae at stage L1 (newly hatched larvae) and L2-3 (2 and 3 days old larvae) while individuals at stage: L4-5 (4 and 5 days old larvae), pre-pupae and pupae (white, pink and black eyes) were grouped by 10 due to their higher body volume. Fiber adsorption lasted 20 min in an incubator at 34°C and 50% humidity before immediate desorption into a gas chromatograph (Varian-Chrompack 4000, USA, CPSil 8 CB-MS 30 m $\times$ 0.25 mm column) with the following parameters: column temperature 40 °C for 2 min, 40 °C to 200 °C at 30 °C.min⁻¹, and a final step from 200 °C to 320 °C at 10 °C.min⁻¹. A clean empty vial was used as a control sample to be certain that E- β -ocimene originated from the bees. The amount of E- β -ocimene of each sample was determined by comparison to a

standard curves obtained by analysing known quantities of external standard (E- β -ocimene, International Flavors & Fragrances, Spain) in the same conditions. A minimum of 4 groups of each stage were sampled. The confirmation of E- β -ocimene was done by a mass spectrometer. The GC–MS system was a Polaris ion-trap mass spectrometer/Trace 2000 GC (ThermoQuest). The mass spectrometer was operated in the electron impact mode at 70 eV with continuous scans (every 0.2 sec) from a mass to charge ratio (m/z) of 60 to 520.

E- β -ocimene effect on workers hypopharyngeal glands development

The same methods were used for the E- β -ocimene treatment and experimental design in Maisonnasse et al. (2009). Briefly, groups of 100 emergent bees from a mix of 4 hives were introduced randomly into 10 cages for treatment and 10 cages for control (Pain cages: 11 × 8.5 × 5.8 cm, Pain, 1966) and separated into two incubators (33°C, 60% RH) to prevent E- β -ocimene dispersion. Bees were kept in the dark and fed with a honey-sucrose candy, fresh pollen (to promote worker glands development, Pernal, Currie, 2000), and water *ad libitum*, from emergence until 14 days of age. For the treatment, the compound was mixed with paraffin oil to allow it to slowly dissipate over 24 hours. The instars L2-3 emitted the higher rate of E- β -ocimene, therefore we assumed that these instars had a more significant effect in the nest. In addition the nurse bees frequently visit cells (Huang, Otis, 1991). Thus we employed a 10 larvae (L2-3) equivalent / caged bee (10µg of E- β -ocimene / bee, 1000µg of E- β -ocimene / cage) and only paraffin oil for the control. The E- β -ocimene and paraffin mix or paraffin only were placed in a wire screen-covered petri-dish at the bottom of the cage so that the bees could never be in direct contact with the petri-dish. The treatment was performed daily in the morning by the replacement of the petri-dish by a new one with the correct treatment. We confirmed the evaporation of 1000µg of E- β -ocimene per cage in 24 hours by sampling, at 3, 6, 12 and 24 hours, the remaining amount of E- β -ocimene in a Pain cage at 34°C (same conditions as the experiment). The quantity of E- β -ocimene release by the solution mixture is high in the cage during the 6 first hours and decreases after 12 hours; at 24 hours only a small quantity of E- β -ocimene is found in the cage.

For each cage, the hypopharyngeal glands were removed from 10 randomly selected bees on day 14 which is the day when the workers have the highest level of protein in these glands (Mohammedi *et al.*, 1996). The size of the acini changes with hypopharyngeal glands development, growing until day 6, stabilizing during days 6 to 14, when workers are known to feed the larvae with royal jelly (Hrassnigg, Crailsheim, 1998), and decreasing from day 15,

until the size of the glands in foragers resembles that of the undeveloped gland of newly emerged bees. The workers glands were removed with forceps through an incision in the front part of the head. The level of gland activation was analysed by dissecting microscope as the size of the gland is positively correlated with gland activity (Deseyn, Billen, 2005). The level of gland development was determined using a 5 point scale classification (undeveloped gland: 1 to full developed gland: 5; usually nurses have a level of gland activation around 2.5 - 3.5 and foragers 1 - 1.5 on average). The total hypopharyngeal glands protein content was also assessed using the Bradford method (Bradford, 1976) for each bee because a higher protein level in the glands gives higher quality nourishment for the larvae. Protein levels were measured via spectrophotometer at 595nm and compared to the standard albumin. The hypopharyngeal glands score and the Bradford assay were done by a blind test to ensure impartiality in the results.

E- β -ocimene effect on workers behavioural maturation

Honey bee experiments were performed in Avignon during June and July of 2008 and 2009. Standardized colonies, called “triple cohort colonies” were conducted to test the effect of E- β -ocimene on honey bee behavioural maturation (Giray, Robinson, 1994). Each colony was composed of 3 cohorts of bees: 500 nurses, 500 foragers and 500 one-day-old bees (*Apis mellifera* sp. honey bees from our apiary). The one-day-old bees were collected from honey bee combs containing the last nymphal stage, which were removed from the hive and placed in an incubator (33°C, 60% RH). One day after, emergent bees (one-day-old bees) appeared on the comb and were painted on the thorax (focal cohort). The foragers, bees with pollen loads (pollen foragers) or distended abdomen (nectar foragers), were captured when they returned to the hive by closing the hive entrance. The nurses, considered to be bees with their head inside a larval cell, were sampled from an open brood frame. For each trial the honey bees came from the same hives to lessen genetic variation. Each test colony was placed in a nucleus (small hive) with two half frames, one full of honey and one empty. In all nuclei, one plastic strip (Bee Boost, PheroTech, Canada) was installed containing the queen mandibular pheromone which mimics a queen (one queen pheromone equivalent released by day, Pankiw *et al.*, 1996). This plastic strip minimizes the natural genetic and pheromonal variation of queens for laying eggs and workers for raising larvae. Workers in this small colonies show normal ontogeny of behaviour (Giray, Robinson, 1994). With these colonies, the age at which focal bees begin foraging is precisely known while keeping constant other potentially important variables, such as colony demography, genetic structure, or pheromone dispersion

(Huang, Robinson, 1996). The age at first foraging of the focal cohort was determined by the age at which the first 50 bees of the focal cohort initiate foraging.

Each trial was formed by three test colony, the first received 10,000 larvae (L2-3) equivalent / day (high dose, equivalent to 20 larvae L2-3 / focal bee or 20 μ g of E- β -ocimene / focal bee), the second 5,000 larvae (L2-3) equivalent / day (low dose, equivalent to 10 larvae L2-3 / focal bee or 10 μ g of E- β -ocimene / focal bee) and the last one only paraffin oil (control). During the spring the queen can lay approximately 1500-2000 eggs per day (Winston, 1987), thus the number of larvae of stage L2-3 is around 3000 to 6000 individuals in the colony. The doses used in this experiment, 5,000 and 10,000 L2-3 larvae equivalent per day, are on a biological scale. Bees were exposed to chronic E- β -ocimene treatment and received E- β -ocimene through evaporation. Four trials were made in 2008 and four trials in 2009. All colonies were placed in a field isolated from others hives to avoid foraging competition and nuclei disturbance. The treatment started when one-day-old bees (focal cohort) were introduced in the nuclei. The E- β -ocimene was mixed in the paraffin. The mixture or paraffin oil alone were introduced into the bottom of the nuclei, in a petri-dish placed below a wire screen-covered; thus the bees could never be in direct contact with the molecule. The treatment was performed daily at 9h00 in the morning without disturbing the colony by removing the petri-dish through a special door behind the nucleus and replacing with another one with the appropriate treatment. Twice a day (once in the morning and once in the afternoon) each nucleus was closed for 45 to 60 min and the nectar or pollen foragers of the focal cohort, accumulated on the screen, were counted and additionally marked.

After 10 days of experimentation and at the end of the trial experiment, we made a census of the number of focal bees and of the total number of bees to prevent potential population variation (mortality) between each nucleus of each trial. Pictures of nuclei frames were taken and all the marked and un-marked bees from each nucleus were counted.

Statistics

Mann–Whitney U tests were used to test differences in E- β -ocimene emission between the different immature instars and for E- β -ocimene effects on worker bee hypopharyngeal glands development. The results of E- β -ocimene influence on honey bee behavioural development were analysed with a two-ways ANOVA (years and treatments) followed by Fisher post-hoc test (STATVIEW 5.0, SAS Institute, Cary, NC).

Results

E- β -ocimene quantification

The production of E- β -ocimene per larva increased from larva stage L1 (3.9 ng/larva/20min) to L2-3 (14.01ng/larva/20min) and decreased at stage L4-5 (0.42ng/larva/20min). These 3 groups produced significantly different amounts of E- β -ocimene (L1 vs L2-3, $Z = -3.441$, $P < 0.001$; L1 vs L4-5, $Z = -3.272$, $P < 0.01$ and L2-3 vs L4-5, $Z = -3.435$, $P < 0.001$).

The amount of E- β -ocimene was high for pre-pupae stage (10.83ng/individual/20min), with no difference production of L2-3 stage ($Z = -1.688$, $P = 0.0914$). Production decreased in the white and pink eyed pupal stages (4.18 and 3.99 ng/pupa/20min respectively) with no difference in production with stage L1 ($Z = -0.293$, $P = 0.817$ and $Z = -2.84$, $P = 0.7697$ respectively). The production declined in the black eyed pupal stage (0.77 ng/pupa/20min) to a level similar to the production in stage L4-5 ($Z = -0.571$, $P = 0.5657$) (Fig. 1A).

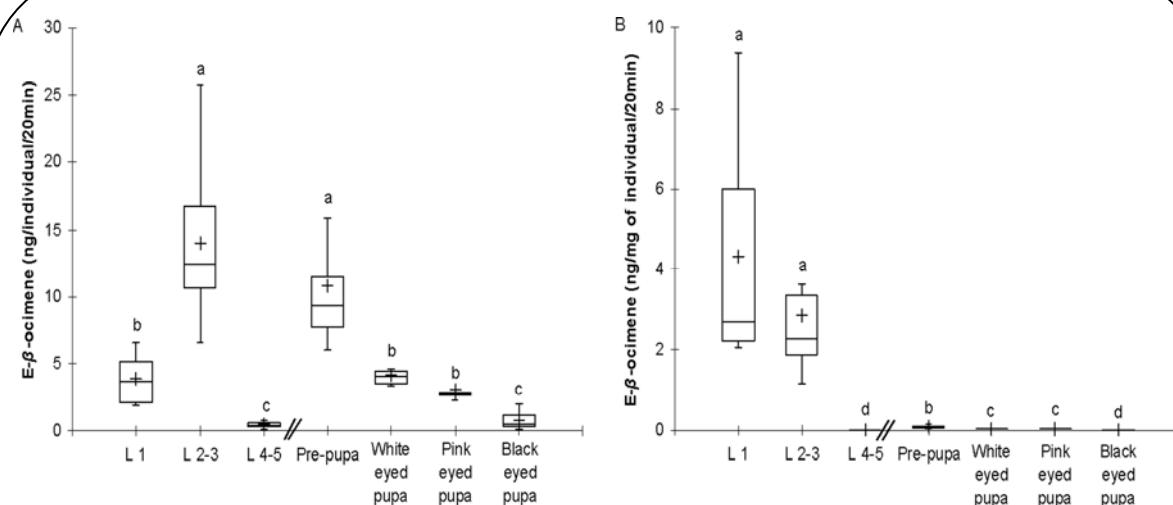


Figure 1: E- β -ocimene emission by the brood during 20 minutes. A. as ng per individual. B. as ng per mg of individual. (Different letters indicate significant differences in individual E- β -ocimene emission ($P < 0.05$) ($n \geq 4$), cross: mean, box: 25%–75%; line in the box: median, whisker: Min-Max, //: larvae cell capping)

The production of E- β -ocimene per mg of individual gave different results. According to their weight the smaller individuals (L1-2-3) produced the highest quantity of E- β -ocimene : L1 = 4.33 ng/mg of larva/20min and L2-3 = 2.84 ng/mg of larva/20min with no significant difference between them ($Z = -1.033$, $P = 0.3017$). The other immature groups produced

significantly less E- β -ocimene ($P < 0.01$) with a maximum of 0.085 ng/mg per individual/20min (Fig. 1B).

E- β -ocimene and workers hypopharyngeal glands development

The level of hypopharyngeal glands development was not significantly different between the honey bees treated with the E- β -ocimene (2.52 ± 0.07) and the control bees (2.72 ± 0.07) ($Z = -0.507$, $P = 0.6120$). The mean protein amount produced by the hypopharyngeal glands was not different between the control group ($57.21 \pm 3.16 \mu\text{g}$ / bee glands) and the E- β -ocimene treated group ($51.04 \pm 2.35 \mu\text{g}$ / bee glands) ($Z = -1.293$, $P = 0.1961$).

E- β -ocimene and workers behavioural maturation

No significant variation in the total population (census) was found among focal cohorts within any trial. The ANOVA test revealed significant treatment and years effect and no interaction (Year: $F_{1,1119} = 318.5$ $P < 0.001$, Treatment $F_{2,1119} = 19.6$ $P < 0.001$, Interaction $F_{2,2399} = 1.0$ $P = 0.3615$). Exposure to E- β -ocimene accelerated the mean age at onset of foraging for both low and high dose groups ($P < 0.01$ and $P < 0.001$ respectively) compared to the control group. Bees with low and high doses of E- β -ocimene started to forage earlier in 7 of 8 trials. The high dose of E- β -ocimene exerted a stronger effect, causing a significantly younger age at the onset of foraging relative to the low dose ($P < 0.01$) (Fig. 2).

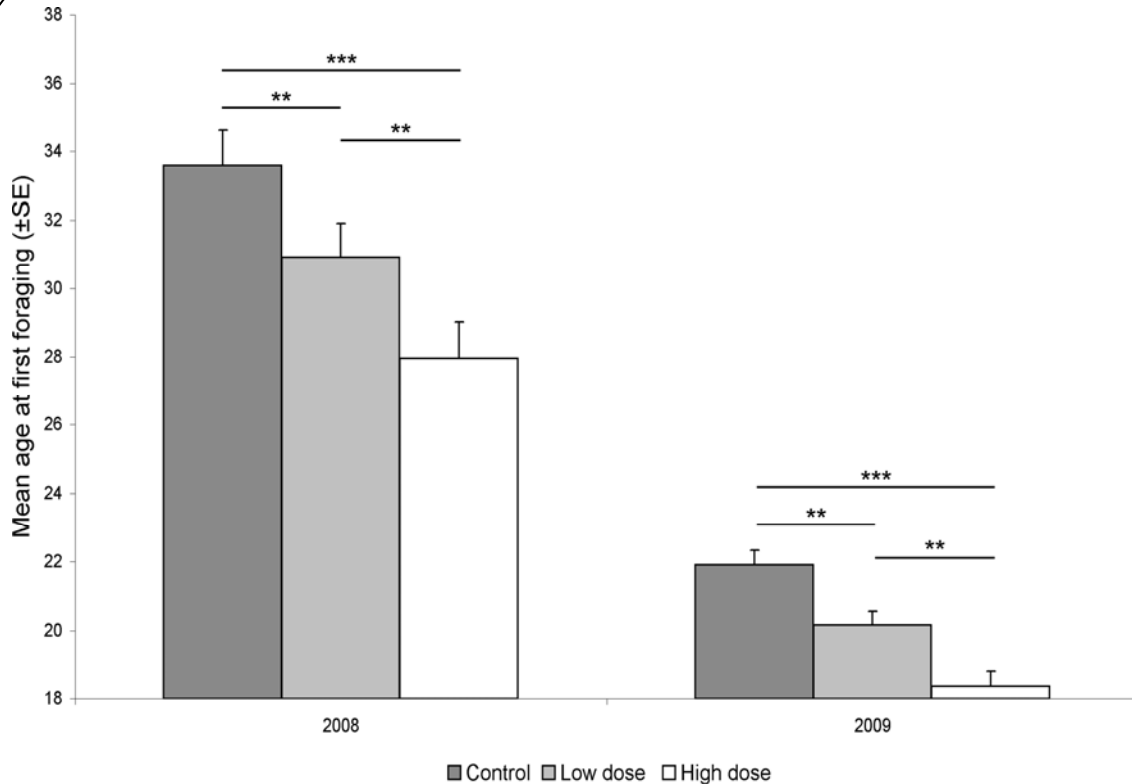


Figure 2: Effect of high and low E- β -ocimene doses on worker age at first foraging. (10 000 larvae and 5000 larvae (stage 2-3) equivalent / day / nuclei respectively, mean age at onset of foraging of the focal cohort for each treatment $\pm$ Standard Error, * denotes significant differences: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$)

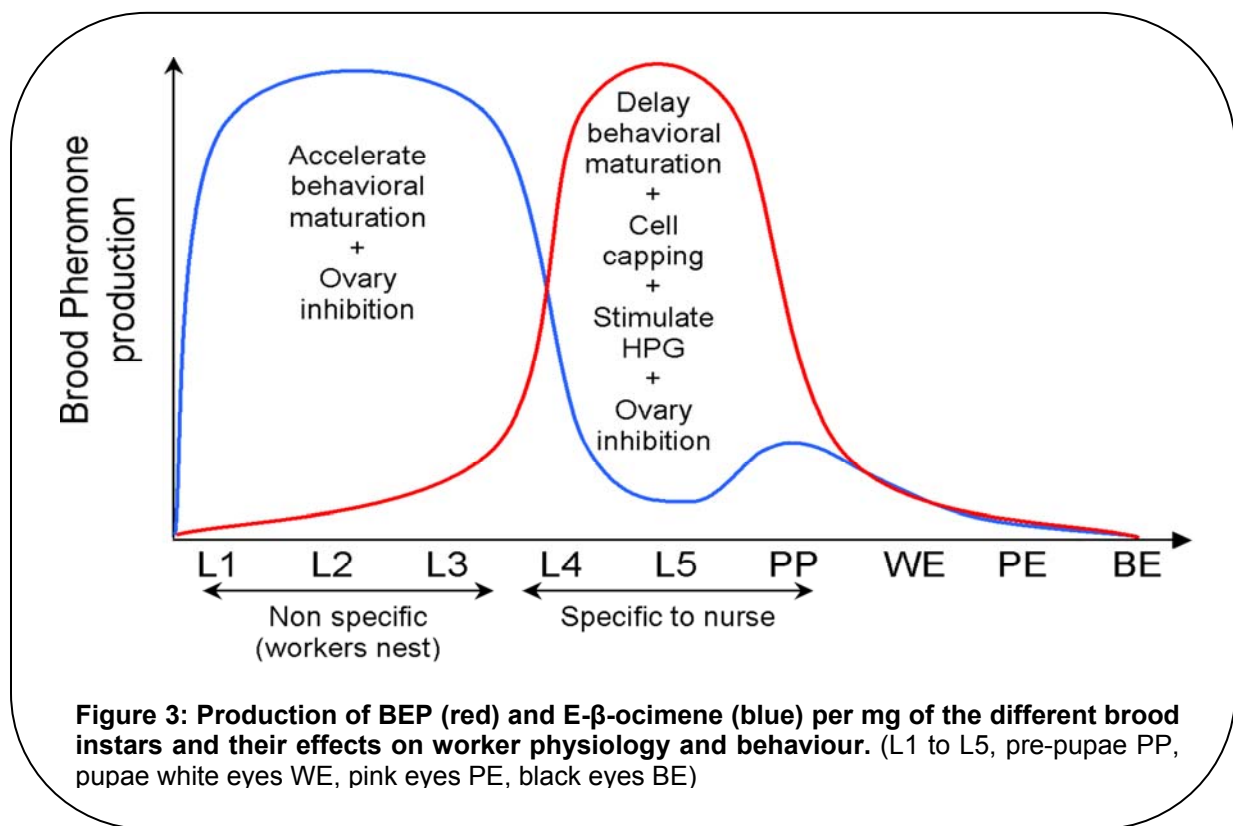
Discussion

In presence of brood, workers initiate foraging earlier compared to broodless workers (Amdam *et al.*, 2009; Le Conte *et al.*, 2001; Tsuruda, Page, 2009). Our results clearly show that E- β -ocimene is a component of the signal emitted by the brood accelerating the age at the onset of foraging for workers with no effect on hypopharyngeal glands activity. Thus, E- β -ocimene induces workers earlier into the task of foraging, thereby optimizing food collection and processing for the colony as well as for larval feeding. E- β -ocimene is a primer pheromone with two actions on workers physiology: inhibition of worker ovaries (Maisonasse *et al.*, 2009) and acceleration of workers behavioural maturation (this paper).

At social level, E- β -ocimene is a compound controlling honey bee behavioural maturation within a complex process that ultimately maintains colony homeostasis. An overabundance of foragers leads to a lack of nurses in the colony, and thus a decline in brood care; conversely

too many nurses cause a decrease in food storage in the colony and a subsequent decline in food for brood nourishment due to the scarcity of foragers. Consequently, a proper nurse-forager ratio is key to maintaining honey bee social homeostasis. Therefore, the regulation of honey bee behavioural maturation must be highly controlled, most likely through a colony-level feedback network. Queen, old brood and foragers produce pheromones, the Queen Mandibular Pheromone (Pankiw *et al.*, 1998a), BEP at high doses (Le Conte *et al.*, 2001) and ethyl oleate (Leoncini *et al.*, 2004b) respectively, which slow down the progression of young bees towards the tasks typical of older bees. But young larvae also have something to say. In producing E- β -ocimene and low doses of BEP (Le Conte *et al.*, 2001), they have the opposite effect of old brood on bee maturation, which is to accelerate worker age at first foraging. In this way, worker maturation occurs in a complex milieu of pheromonal compounds. Considering that workers adjust their behavioural development in response to specific pheromones in the nest (Le Conte *et al.*, 2001), modification of pheromone production by the queen or the brood could change the pheromone level in the hive and trigger variation in worker maturation. Alternatively, the different pheromones could target different worker castes. For example, the middle-aged bees' transition to foragers is important for maintaining the dynamic caste ratio (Johnson, 2010). E- β -ocimene could be the signal for the transition of middle-aged bees to the forager caste, while BEP could slow the transition from nurse to the middle-aged bee caste. Further experiments are needed to understand the direct effect of larvae, but also queen and worker signals, on the middle-aged bee group. These complementary experiments integrating other important factors, like pheromone dose or role of a specific caste, should be done to resolve the question of the complex role of pheromones in honey bee social regulation.

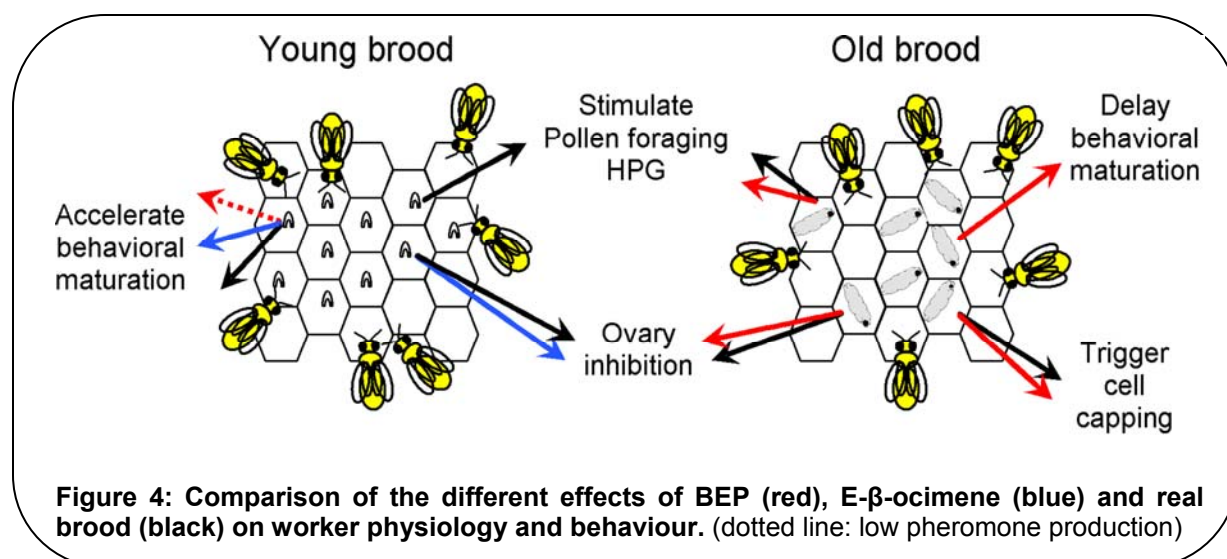
At individual level the young and the old larvae emit different quantities of pheromones that have different volatilities. Taken as the amount of compound produced per gram of larvae, E- β -ocimene is emitted principally by the young instars (L1, L2-3) while BEP reaches a maximum value during the capping stage (L4-5) (Trouiller *et al.*, 1991) (Fig. 3). E- β -ocimene (boiling point 73°C), which belongs to the terpene family, is volatile so it has an aerial transmission (targeting all worker castes), while the BEP (boiling point around 200°C), which belongs to the ester family, has a low volatility which is transmitted by contact (target workers close to the larvae cells).



These two specific pheromonal signals have opposing effects on workers (Fig. 3,4). By emitting a low quantity of BEP and a great amount of E-β-ocimene, young larvae are able to accelerate the age at onset of foraging of worker bees (Le Conte *et al.*, 2001; Pankiw *et al.*, 2004). In contrast, old larvae inhibit honey bee behavioural development by producing a high quantity of BEP (Le Conte *et al.*, 2001). Thus young and old larvae play opposite roles in the behavioural maturation of worker bees according to their specific needs. The young larvae promote foraging (low need in nurses) and old larvae promote tending (high need in nurses). We then presume that young larvae need less attention from nurses than old larvae. For instance, young and old larvae do not have the same workers needs. When worker eggs hatch, young larvae are provided with royal jelly from the mandibular and hypopharyngeal glands of the nurses until they reach an age of 3.5 days old (Winston, 1987). Afterwards, old larvae receive brood food, a mixture principally made of the nurse's hypopharyngeal glands secretions, honey and pollen. This brood food mixture is given to old larvae by the nurses in higher quantities (Brodschneider, Crailsheim, 2010; Schmickl, Crailsheim, 2002; Winston, 1987). After food requirement, old larvae need nurses to help in capping their cells, and then, still require nurses and hive workers for their thermoregulation, as they are very sensitive to cooling (Stabentheiner *et al.*, 2010).

As a consequence, old larvae by emitting BEP, keep nurses in contact with them for a longer time, develop worker hypopharyngeal glands (Mohammedi *et al.*, 1996; Pankiw *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2010) and engage them in specific tasks like capping cells, nourishment or tending (Le Conte *et al.*, 1990; Le Conte *et al.*, 1995a; Le Conte *et al.*, 1995b; Le Conte *et al.*, 1994). On the contrary, young larvae by producing E- β -ocimene, accelerate worker maturation (workers become foragers earlier in life) thereby optimizing foraging and food collection.

Thus we can consider BEP as a “specific worker caste signal”, with a specific and local action in the colony: the tending of old larvae. And then, we propose E- β -ocimene as a “non-specific worker castes signal” with a global action on the colony: increasing food provision.



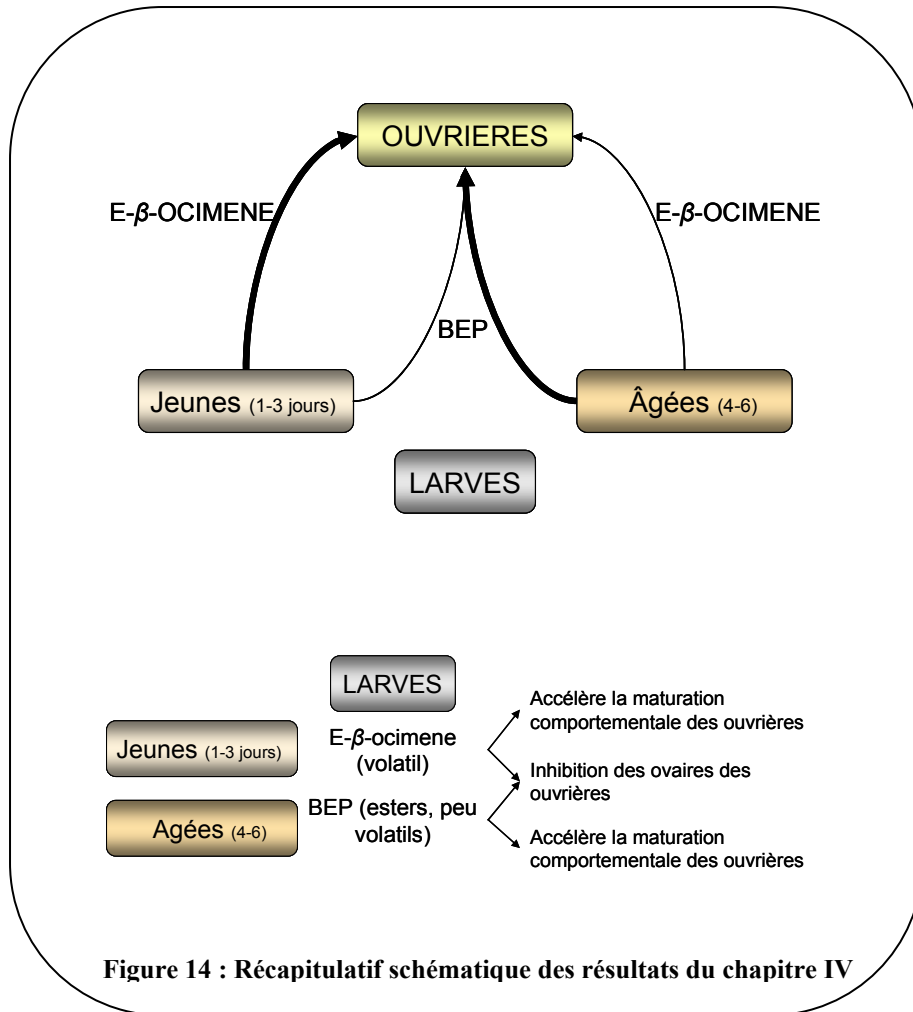
Therefore, by emitting E- β -ocimene and BEP, the young and old larvae signals are involved in enforcing different worker tasks (Fig. 4); nevertheless they also have a common action in the nest: the inhibition of worker ovary activation (Maisonnasse *et al.*, 2009; Mohammedi *et al.*, 1998). This plays a major role in the productivity of the nest because as reproductive workers do not work as hard as sterile workers (Dampney *et al.*, 2004), showing a reduction in both tending to larvae and foraging tasks, which decreases the inclusive fitness of the colony. E- β -ocimene and BEP both partially inhibit the worker ovary activation, and a possible synergistic interaction needs to be tested. In addition, workers can escape from the reproductive control induces by queen and brood (Hoover *et al.*, 2005b). But the difference between E- β -ocimene and BEP in their temporal production, mode of transmission and targets could be a strong barrier against the development of reproductive workers in the colony by

decreasing their potentiality to bypass pheromonal control. According to theories of social insect communication, an honest signal is expected to be relatively simple while a complex signal would indicate the presence of a coercive force between sender and receiver (Heinze, d'Ettorre, 2009; Keller, Nonacs, 1993). In this way by using two pheromones larvae would repress the activation of the worker's ovaries. By definition coercion in social *Apis mellifera* is a form of pressure to prevent workers from acting selfishly and thereby harming group or colony as a whole (Ratnieks, Wenseleers, 2008). In *Apis mellifera* workers are frequently coerced into acting altruistically (Ratnieks, Wenseleers, 2008): workers repress reproduction of other workers through egg eating and aggression (policing) (Heinze, 2004; Ratnieks *et al.*, 2006). Thus the coercion of laying workers bees to remain sterile comes from policing by other workers, but also from pheromones of the larvae and queen. This colony-level coercion, or colony arms race, against reproductive workers would benefit the group and increase its inclusive fitness. Therefore despite using a dishonest signal in the nest to control reproduction, this communication seems to serve the entire society.

The production of two different types of pheromones by the larvae, gives a powerful signal to adjust all workers for colony tasks, especially larval care. E- β -ocimene is a young larval pheromone, highly volatile, and easily dispersed within the colony for a large scale action while BEP is an old larval pheromone with low volatility, spread by contact, with a precise action. The complementary effect of these pheromonal components supports also the hypothesis that a special chemical syntax exists in the colony for fine-tuning social regulation. It also confirms the remarkable and unexpected complexity of honey bee pheromonal communication.

Acknowledgements

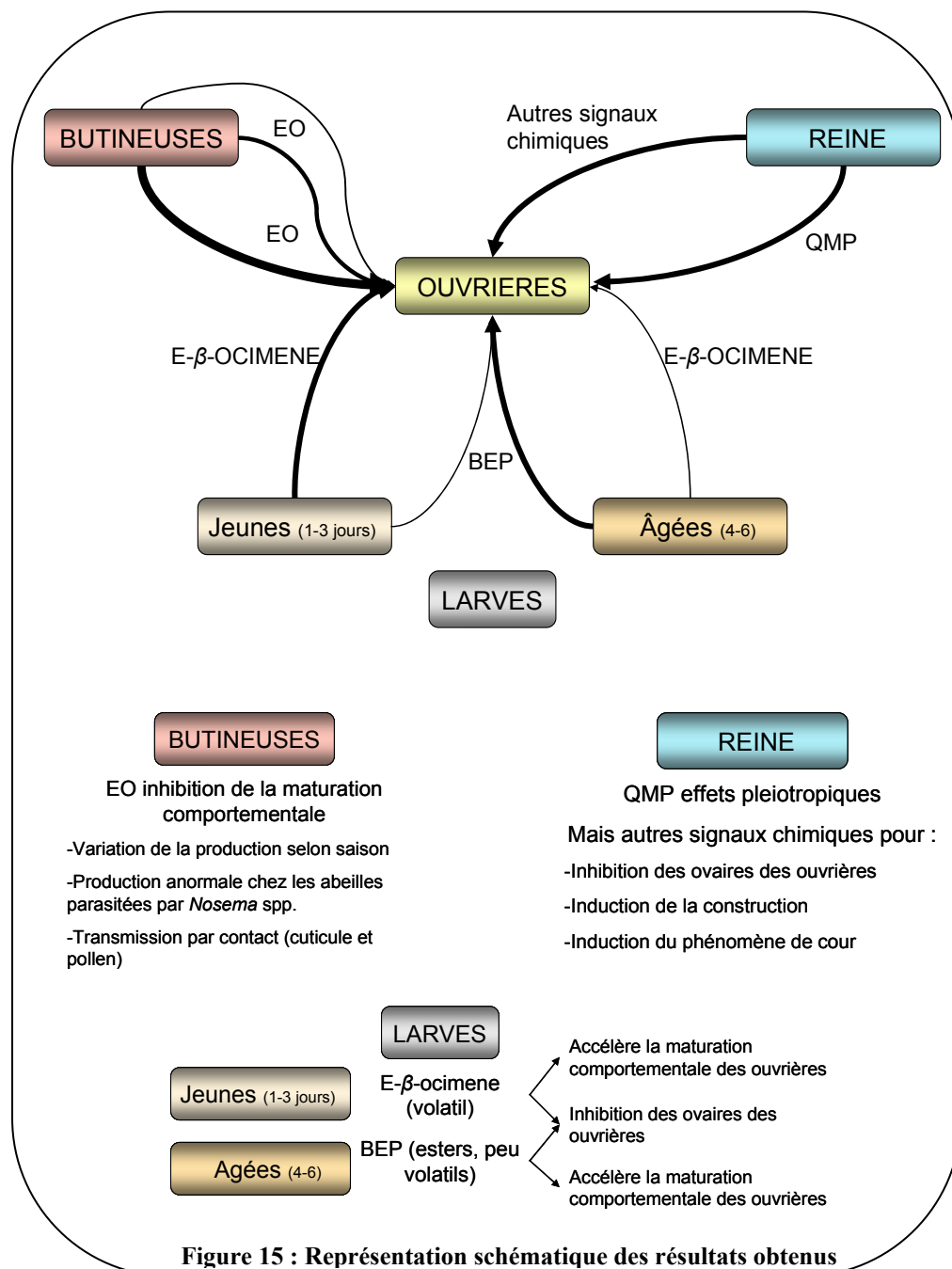
We thank Aurelie Baldy, Thomas[†] and Martin Le Conte, for their help in the experimental set up and lab and field experiments; Guy Costagliola for his assistance in chemical analysis; Cedric Alaux, Cynthia McDonnell and two anonymous referees for their comments that improved the manuscript.



Chapitre V Discussion générale

Chapitre V Discussion générale

Cette étude montre trois résultats majeurs (Fig. 15) : la découverte d'une nouvelle phéromone chez le couvain, la mise en évidence de fluctuations de la production de l'EO, et la mise en avant d'un système phéromonal redondant, notamment chez la reine. Ces résultats permettent d'améliorer les connaissances des régulations sociales chez l'abeille par les phéromones.

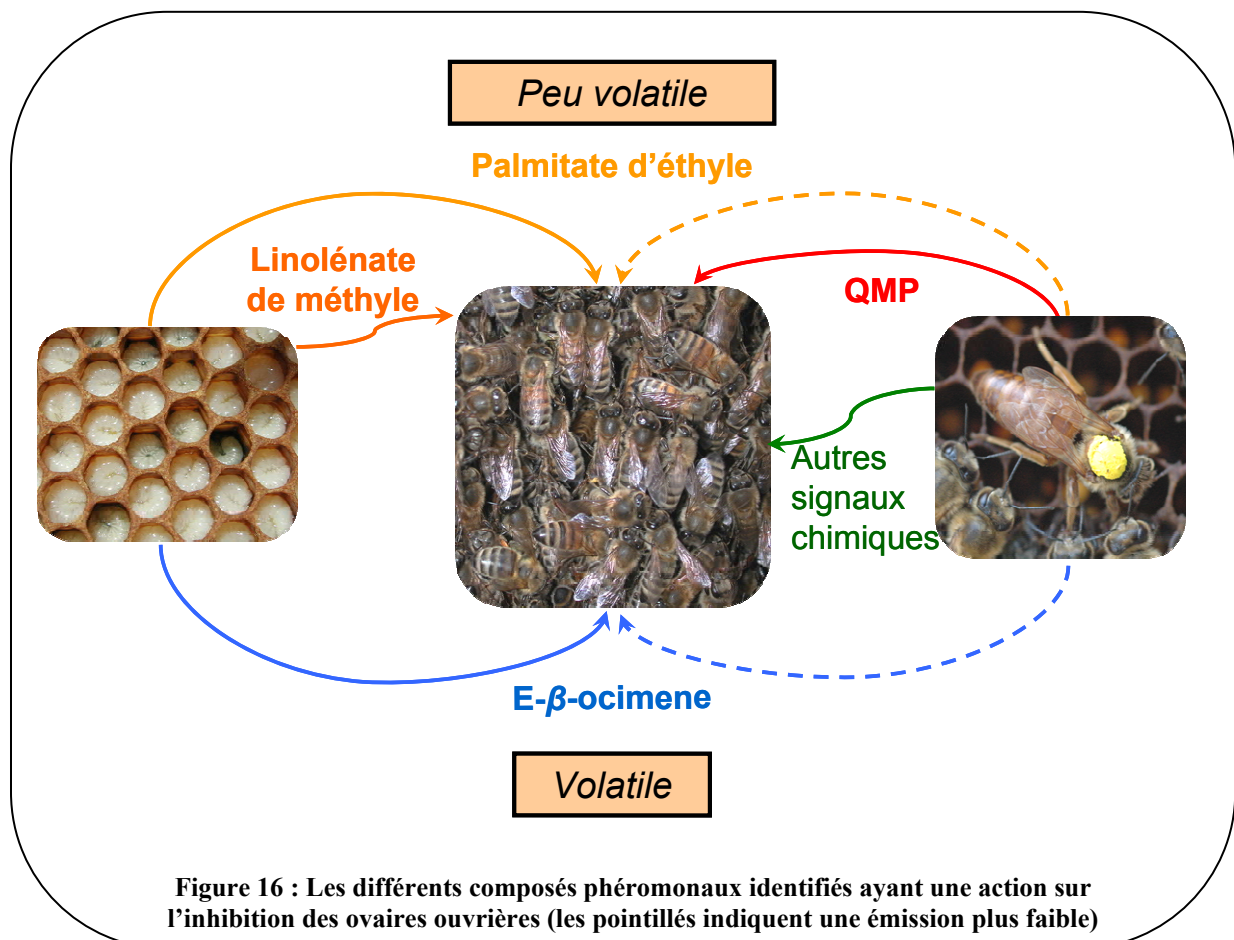


I- Phéromones et régulations sociales

A- Régulation de la reproduction des ouvrières

Notre travail a permis :

- La caractérisation d'une nouvelle phéromone larvaire inhibant le développement ovarien des ouvrières : le E- β -ocimène. Cette molécule est produite majoritairement par les larves de stade L1 et L2-3 (jeune couvain) à hauteur d'environ 1 μ g par larve en 24 heures. La grande volatilité de ce composé lui confère un avantage de distribution dans la colonie.
- La mise en évidence de potentiels composés émis par la reine pour réguler la reproduction de la colonie. Une reine sans 9-ODA est capable d'inhiber le développement des ovaires des ouvrières, orienter la construction de cire (cellules au format ouvrière) et engendrer un comportement de cour de la part des ouvrières (dispersion par contact des composés). Nous avons mis en évidence chez la reine, l'existence d'un système phéromonal complémentaire et redondant de la QMP.

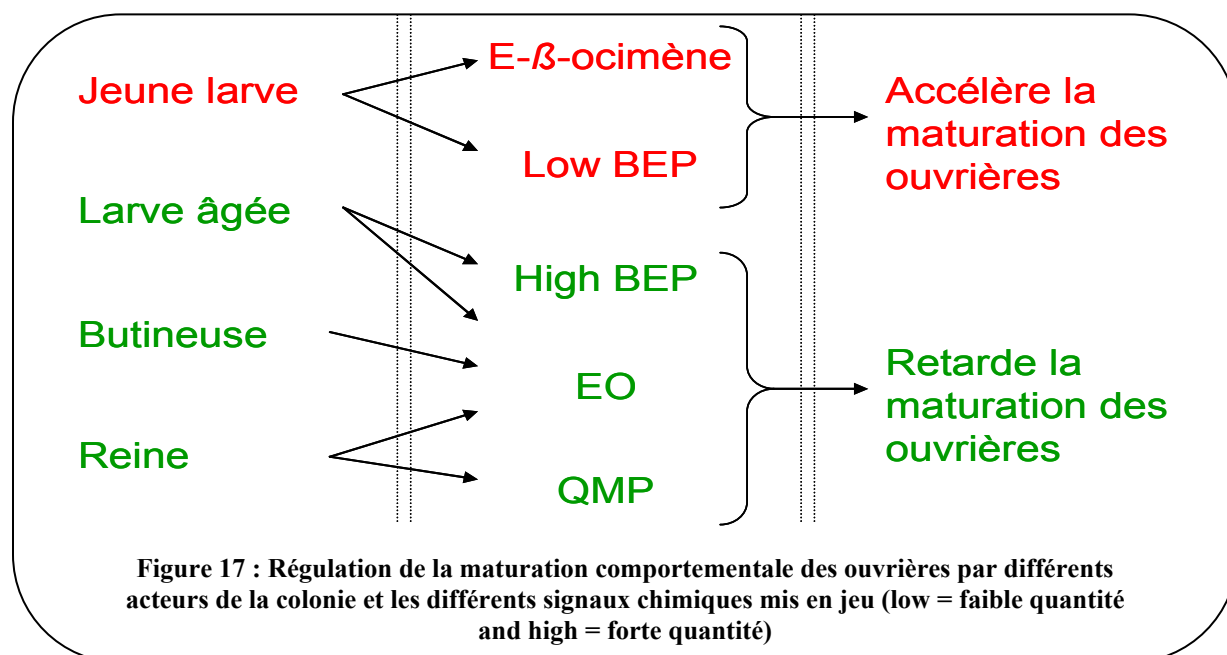


La figure 16 présente un système phéromonal complexe pour l'inhibition du développement des ovaires des ouvrières. Ces différents signaux chimiques pris séparément induisent une inhibition partielle des ovaires des ouvrières ce qui suggère, comme nous l'avons démontré, que d'autres signaux chimiques inhibiteurs existent chez la reine et peut-être chez le couvain, ou que ces différents signaux chimiques agissent synergiquement.

B- Régulation de la maturation comportementale

La régulation du ratio nourrices / butineuses est importante pour l'équilibre de la société d'abeilles. Ce ratio est optimum dans la colonie et est contrôlé en partie par différentes phéromones à savoir la BEP, le E- β -ocimène, l'EO et la QMP produites par les larves, les butineuses et la reine (Fig. 17). Notre travail a permis de mettre en avant que :

- La production de l'EO par les ouvrières est variable et dépend du contexte environnemental de la colonie plutôt que de l'origine génétique de la colonie. L'EO est transmis des butineuses vers les nourrices par contact : cuticule-cuticule, cuticule-antenne, pollen-antenne et par l'ingestion et la manipulation du pollen.
- La production de l'EO par des abeilles parasitées par *Nosema* spp. est corrélée au nombre de spore de *Nosema* spp qu'elles contiennent. Les abeilles infectées produisent des quantités anormalement élevées d'EO, ce qui dérègle la communication chimique au sein de la colonie.
- le E- β -ocimène produit par les jeunes larves, à l'inverse des autres acteurs, accélère la maturation comportementale des ouvrières.



Dans la colonie la maturation des ouvrières est régulée, en partie, par un mélange de composés phéromonaux. Á un temps précis, les ouvrières sont en présence de différentes concentrations de phéromones. Et en fonction de leurs sensibilités, les ouvrières accélèrent ou retardent leur maturation comportementale. Par exemple, les MAB sont des abeilles d'intérieur qui lors de la réception du nectar sont en contact régulier avec l'EO de la cuticule des butineuses et pourraient plus facilement être inhibées dans leur maturation comportementale.

C- Théories de la maturation comportementale

Dans la colonie d'abeilles, les études sur la régulation sociale peuvent être interprétées par des explications du comportement

- sur la base des stimuli de déclenchement
- par les mécanismes internes
- par l'évolution.

Différentes théories expliquent la division des tâches des abeilles. Ces théories mettent en relation deux hormones, la JH et la Vg, qui s'inhibent réciproquement (Guidugli *et al.*, 2005). Les nourrices ont des taux élevés de Vg et de faibles taux de JH et les butineuses de faibles taux de Vg et de forts taux de JH.

La première théorie « l'Activateur / inhibiteur modèle AIM » implique la JH comme activateur du comportement de butinage (Huang, Robinson, 1992; Robinson, Vargo, 1997). Chez les abeilles, la fonction de la JH aurait évolué de son action sur la reproduction vers la modulation du développement comportemental des ouvrières (Robinson, 1992). La présence d'un faible pic de JH avant la synthèse de la Vg suggère que la JH induit la synthèse de Vg (Ihle *et al.*, 2010; Jassim *et al.*, 2000) puis l'augmentation de la synthèse de la JH induit un arrêt de la synthèse de la Vg (Engelmann, 1983; Guidugli *et al.*, 2005).

La théorie de « The reproductive ground plan hypothesis RGPH » corrèle le développement ovarien (nombre d'ovarioles) des ouvrières, incluant la Vg, et la division du travail (Amdam *et al.*, 2006; Amdam *et al.*, 2004). La relation du comportement de butinage et de la physiologie de reproduction des ouvrières, incluant la Vg, provient de gènes ancestraux et de

facteurs endocriniens qui lient les aspects du comportement de recherche de nourriture et la physiologie reproductive (Amdam *et al.*, 2006; Amdam *et al.*, 2004). Ici le rôle de la Vg est central, car elle possède deux fonctions : le choix du type de butinage (nectar ou pollen) est associé à une variation de la production de Vg (forte ou faible) chez l'ouvrière nourrice et la transition des nourrices vers le stade butineuse est inhibée par la Vg (Page, Amdam, 2007).

La théorie de « The double repressor hypothesis DRH » (Amdam, Omholt, 2003) donne un rôle central à la Vg mais également une fonction à la JH. La Vg est l'inhibiteur du développement comportemental des abeilles et supprime la synthèse de JH. La chute de la production de la Vg induit le changement comportemental de nourrice à butineuse et une induction de la synthèse de JH. Mais ensuite, les forts taux de JH suppriment la synthèse de la Vg, « bloquant » ainsi l'abeille au stade butineuse (Amdam, Omholt, 2003; Ihle *et al.*, 2010).

Les spécificités du contexte (environnement de la colonie, informations sociales) impliquées dans l'auto-inhibition entre la JH et la Vg, sont complexes et interviennent en périphérie de ces différentes théories (Fig. 18). Les théories de l'AIM et de la DRH impliquent, en plus d'un régulateur interne (RI) (la JH et la Vg), un régulateur externe (RE) pouvant jouer respectivement sur la JH et sur le système nerveux central, modifiant en retour les taux hormonaux et *in fine* la maturation des abeilles. Ce régulateur externe est composé en partie des phéromones impliquées dans la maturation des ouvrières. Les phéromones sont des stimuli qui modifient les mécanismes liés à la maturation comportementale, et notamment les hormones liées à ces mécanismes.

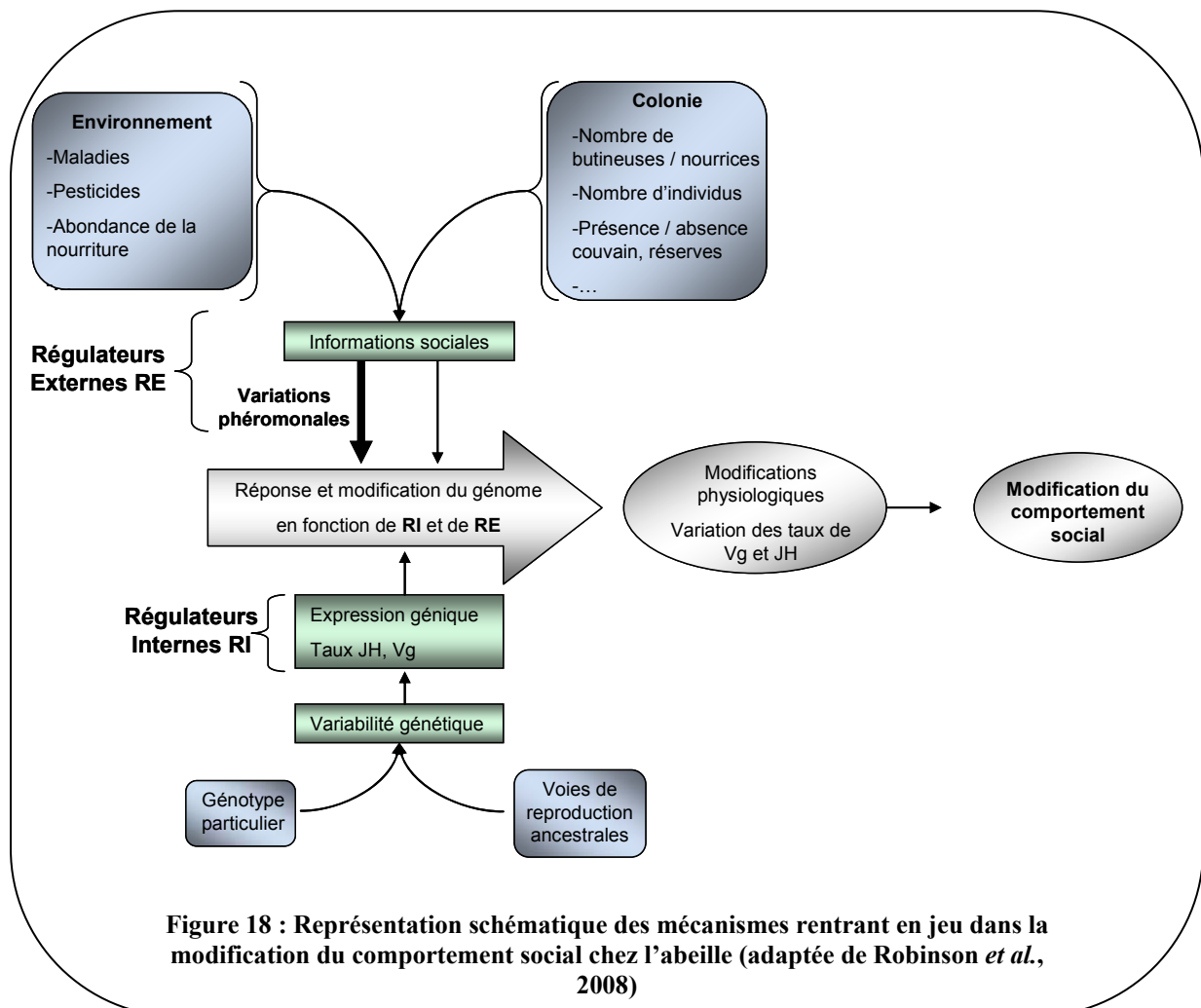
La QMP et la BEP, à fortes doses inhibent le taux de JH des ouvrières durant leur développement comportemental (Kaatz *et al.*, 1992; Le Conte *et al.*, 2001; Pankiw *et al.*, 1998a). A l'inverse, la QMP augmente les taux de Vg associés au stade nourrice et de faibles doses de BEP diminuent le taux de Vg associé au stade butineuse (Fischer, Grozinger, 2008; Smedal *et al.*, 2009). Les effets des phéromones sur les taux hormonaux des ouvrières sont en adéquation avec l'effet des phéromones sur la régulation de la maturation comportementale des ouvrières (Alaux *et al.*, 2010b). Les effets de l'EO et du E- β -ocimène sur le système hormonal n'ont pas encore été testés. Mais puisque l'EO inhibe le développement comportemental des abeilles, l'hypothèse qu'il puisse inhiber la production de la JH et augmenter l'expression de la Vg peut-être émise. Le E- β -ocimène à l'inverse accélère la maturation des abeilles, il pourrait augmenter les taux de JH et inhiber la production de la Vg chez les ouvrières.

Les mécanismes de régulations externes (RE) et internes (RI) interfèrent entre eux et induisent une réponse commune dans les comportements sociaux (Robinson *et al.*, 2008) (Fig. 18). D'après Robinson G E *et al.* (2008):

- l'information sociale (RE) modifie l'expression des gènes dans le cerveau pour influencer le comportement social.
- les variations génétiques (RI) influencent le fonctionnement du cerveau puis le comportement social

Selon son bagage génétique, ses taux hormonaux, son nombre d'ovarioles, une ouvrière produit un taux de phéromones précis. Une butineuse (taux de JH élevé) produit de l'EO en forte quantité alors que les nourrices (taux de Vg élevé) ne produisent que peu ou pas d'EO. D'après ces taux hormonaux, une abeille a une tendance à accélérer ou retarder son développement comportemental, les phéromones modulent cette tendance en la renforçant ou en l'inhibant.

De ce fait, les RI et les RE doivent être associés pour l'étude des mécanismes impliqués dans les régulations sociales de la colonie.



D- Complexité de la communication chimique

Pourquoi existe-t-il autant de phéromones dans la colonie et pourquoi les phéromones ont-elles une redondance dans leurs effets ?

Il existe plusieurs types de redondances phéromonales dans la colonie d'abeilles :

- Une même phéromone peut être émise par différents acteurs avec des effets analogues dans la colonie.
- Différents composés phéromonaux actifs peuvent être produits par le même acteur avec des effets similaires dans la colonie.
- Différents composés phéromonaux actifs peuvent être produits par différents acteurs avec des effets similaires dans la colonie.

La complexité et la redondance phéromonale peuvent être en partie expliquées dans deux théories de la communication chimique chez l'abeille :

- La première théorie est évolutive et met en concurrence deux types de langages dans la colonie : un signal honnête ou un contrôle forcé (Heinze, d'Ettorre, 2009; Keller, Nonacs, 1993).
- Nous proposons une deuxième théorie, qui s'appuie sur la communication en général et qui révèle une « syntaxe » particulière en réponse à la complexité de la société.

a- Première théorie : un signal honnête ou un contrôle forcé

Selon la théorie de la communication sociale des insectes, un signal honnête est relativement simple (un composé phéromonal engendre une action). Par contre, un contrôle complexe indique la présence d'une force coercitive entre l'émetteur et le récepteur (Heinze, d'Ettorre, 2009; Keller, Nonacs, 1993). Cette théorie s'applique largement à la régulation de la reproduction dans la colonie d'abeilles.

Les phéromones, dans les colonies populeuses, peuvent agir comme un signal honnête en indiquant aux ouvrières un signal de fertilité de la reine à travers, soit, ses propres phéromones, soit les phéromones du couvain. Le couvain peut être associé également à la fertilité de la reine puisqu'il est représentatif de la ponte, donc de la fertilité de la reine

(Keller, Nonacs, 1993; Strauss *et al.*, 2008). En présence de ce signal honnête, les ouvrières freinent leur reproduction lorsque leurs bénéfices indirects sont plus importants qu'un bénéfice individuel. Quand les ouvrières perçoivent une diminution de la fécondité de la reine (diminution de la production des phéromones larvaires, absence des phéromones de la reine), elles activent leurs ovaires pour produire des mâles (Strauss *et al.*, 2008).

Mais un contrôle de la reine et du couvain par, entre autres, l'utilisation de phéromones est également possible. Un contrôle de la reproduction des ouvrières permet à la reine et au couvain d'améliorer leurs fitness au dépend des ouvrières (Keller, Nonacs, 1993). Cette réduction de la fitness des ouvrières engendre une réaction de celles-ci qui essayent de devenir tolérantes à ce contrôle ou de contourner le système. Le couvain et la reine améliorent continuellement leurs contrôles pour toujours être en mesure de réguler la reproduction des ouvrières. Si la colonie contrôle les ouvrières, elle possède un système complexe empêchant les ouvrières de développer leurs ovaires. Pour cela elle doit disposer de signaux différents, complémentaires et redondants, pour limiter les probabilités qu'ont les ouvrières de contourner l'inhibition.

La colonie entière participe à la régulation des ovaires des ouvrières. La reine émet la QMP (composée de 5 molécules), du E- β -ocimène (Gilley *et al.*, 2006) et du palmitate d'éthyle en faibles quantités, et un autre puissant signal qui n'a pas encore été découvert provenant peut être des glandes tergaes (Wossler, Crewe, 1999a) ou de la glande de Dufour, par exemple (Katzav-Gozansky, 2006). Le couvain produit de la BEP et notamment deux de ces composés, le linoléate de méthyle et le palmitate d'éthyle (Mohammedi *et al.*, 1998), mais également du E- β -ocimène. Ces différentes phéromones présentent différentes volatilités permettant une transmission et une perception vers et par les récepteurs (ouvrières) différents. La production de phéromones communes et différentes donne aux deux castes un avantage dans le contrôle de la reproduction. Les ouvrières stériles participent aussi au contrôle de la reproduction des ouvrières non pas par l'émission de phéromones (non démontré jusqu'à maintenant), mais par l'agression, ou la consommation d'œufs d'ouvrières reproductrices (policing) (Ratnieks, Visscher, 1989). La colonie utilise différents modes d'inhibition de la reproduction des ouvrières : le comportement d'agression, et les composés chimiques, et semble créer une barrière contre les individus reproducteurs.

Mais cette barrière peut parfois être franchie. Par exemple, certaines colonies d'abeilles sont moins sensibles à la QMP (Pankiw *et al.*, 1994) ce qui laisse supposer que ces abeilles sont

moins inhibées dans leur reproduction. Dans les colonies anarchiques (Oldroyd *et al.*, 1994), ou un nombre anormal d'ouvrières développe ses ovaires, la reine produit des taux normaux de QMP (Hoover *et al.*, 2005a). Des différences dans la transmission ou la réception de la QMP ou une diminution de la sensibilité des ouvrières anarchiques à cette phéromone, ou à d'autres, peuvent être la cause de cette sur-activation ovarienne chez ces ouvrières (Hoover *et al.*, 2005a).

D'après Strauss *et al.* (2008), le 9-ODA affecte l'activation des ovaires des ouvrières indépendamment du statut de reproduction de la reine ; ce composé ne serait donc pas un signal honnête. Il semble que les phéromones royales de la QMP contrôlent la reproduction des ovaires des ouvrières plutôt que les ouvrières s'abstiennent de se reproduire. Dans ce cas, les substances émises par la reine seraient donc une force coercitive.

La redondance phéromonale de la part des larves et de la reine, le policing et l'évidence que certaines ouvrières essaient de contourner les barrières mises en place par la colonie, montrent que l'inhibition de la reproduction dans la colonie tend vers un contrôle. La communication phéromonale de la reine et du couvain évolue continuellement (redondance phéromonale) pour inhiber la reproduction des ouvrières, tandis que les ouvrières évoluent en permanence pour résister (contournement des barrières chimiques) (Katzav-Gozansky, 2006).

Dans cette même théorie, le signal honnête et la force coercitive pourraient coexister dans la colonie.

La reine et les ouvrières reproductrices produisent des sécrétions d'esters et d'hydrocarbures spécifiques de la glande de Dufour, différentes des individus stériles (Katzav-Gozansky *et al.*, 2002a; Malka *et al.*, 2009b), et les reines fécondées produisent des taux différents de la QMP par rapport aux reines vierges (Plettner *et al.*, 1997) (signaux honnêtes). Les ouvrières sont également plus attirées par des extraits chimiques de reines avec une forte activation ovarienne (Kocher *et al.*, 2009). Mais d'autres études indiquent que les ouvrières varient leur réponse à la phéromone royale en fonction de leur développement ovarien (Kocher *et al.*, 2010). Les modèles de signaux honnête et du contrôle forcé coexistent dans le système social reine-ouvrière (Kocher *et al.*, 2009).

D'après la figure 13, la reine et le couvain partagent des molécules phéromonales et ont chacun des molécules phéromonales spécifiques pour l'inhibition du développement des

ovaires des ouvrières. Il se peut que les signaux partagés par la reine et le couvain puissent être des signaux honnêtes dans la colonie. Le E- β -ocimène n'est produit que chez des reines fécondées (Gilley *et al.*, 2006) et par le couvain. Le couvain, qui n'est présent dans la colonie que lorsque la reine pond, donc lorsqu'elle a acquis son statut de reproductrice, pourrait envoyer des signaux honnêtes dans la colonie comme signaux fiables de la fécondité de la reine. Les signaux individuels, tels la QMP, resteraient des forces coercitives. La présence de signaux honnêtes et de contrôles permettrait par exemple à la reine d'asseoir son statut de reproductrice avant d'être fécondée, et de pouvoir ensuite émettre un signal de fertilité et de contrôle de la reproduction pour diminuer la « course à la reproduction » dans la colonie.

b- Seconde théorie : une syntaxe précise dans la communication de l'abeille

Une deuxième théorie explique la complexité et la redondance phéromonales dans la colonie d'abeilles. Dans cette théorie, la redondance et la complexité des phéromones sont utilisées pour construire une « syntaxe » communicative entre les individus de la colonie. Chaque caste, groupe, ou acteur de la colonie produit, et est sensible, aux phéromones. Pour une action importante dans la colonie, des signaux chimiques différents sont utilisés par différents acteurs (redondance), comme pour la régulation de la reproduction des ouvrières. Par contre pour un message d'un individu à un autre le message est précis, comme lors de l'émission d'une concentration précise de BEP par les larves âgées, incitant l'operculation de leurs cellules par les nourrices. L'efficacité de l'information transmise par la communication chimique dans la colonie dépend des synergies, du contexte, de la production, transmission et réception du signal, et des seuils de réponse des individus. Ces différents paramètres induisent un signal précis, pour que les individus répondent et s'adaptent à l'information de la société. La complexité de la communication phéromonale répond à la complexité de la société.

Synergie

Les phéromones peuvent interagir pour réguler davantage la vie sociale de la colonie. Par exemple, la QMP et la BEP n'interagissent pas pour inhiber le développement des ovaires des ouvrières (Hoover *et al.*, 2005b), mais ont un effet synergique sur le développement des glandes hypopharyngiennes des ouvrières (Peters *et al.*, 2010). Un grand nombre de composés phéromonaux sont produits dans la colonie par tous les acteurs, de nombreuses synergies sont donc possibles. Les synergies entre composés phéromonaux permettent de renforcer un signal.

Contexte

Le contexte joue un rôle important dans le système de communication chimique. Par exemple, l'oléate de méthyl est perçu comme un signal émis par les larves pour l'operculation de leurs cellules par les ouvrières (Le Conte *et al.*, 1990), mais est également un élément synergique de la phéromone de cour (QRP) (Keeling *et al.*, 2003). En fonction de sa tâche et de son environnement, l'individu peut répondre différemment à une même phéromone.

Transmission

La transmission d'une phéromone peut être différente selon sa volatilité, la phéromone de la glande de Nasonov composée de molécules volatiles n'est pas transmise de la même façon que la QMP qui est composée de molécules peu volatiles. Les composés volatils sont transmis passivement à tous les membres de la colonie, par contre, les composés non ou peu volatils ont besoin d'un transport actif de la part des ouvrières (contact) (Naumann, 1991; Naumann *et al.*, 1993; Naumann *et al.*, 1991).

Réception

Comme les différents acteurs de la colonie produisent différentes molécules, les ouvrières ont besoin de différents récepteurs pour intégrer le message (Wanner *et al.*, 2007). Les mâles ont un récepteur spécifique du 9-ODA (*AmOr11*), et celui-ci ne répond à aucune autre molécule du bouquet phéromonal de la QMP et de la QRP (Wanner *et al.*, 2007). Par exemple, selon l'âge de l'abeille, certains récepteurs peuvent être actifs et d'autres non. Il est généralement accepté de dire que les jeunes ouvrières sont très attirées par la QMP et que les butineuses évitent cette phéromone, une différence de récepteurs à cette phéromone existerait chez ces deux castes. Selon le développement comportemental de l'ouvrière, des récepteurs s'activent et se désactivent, permettant une sensibilité différente aux phéromones.

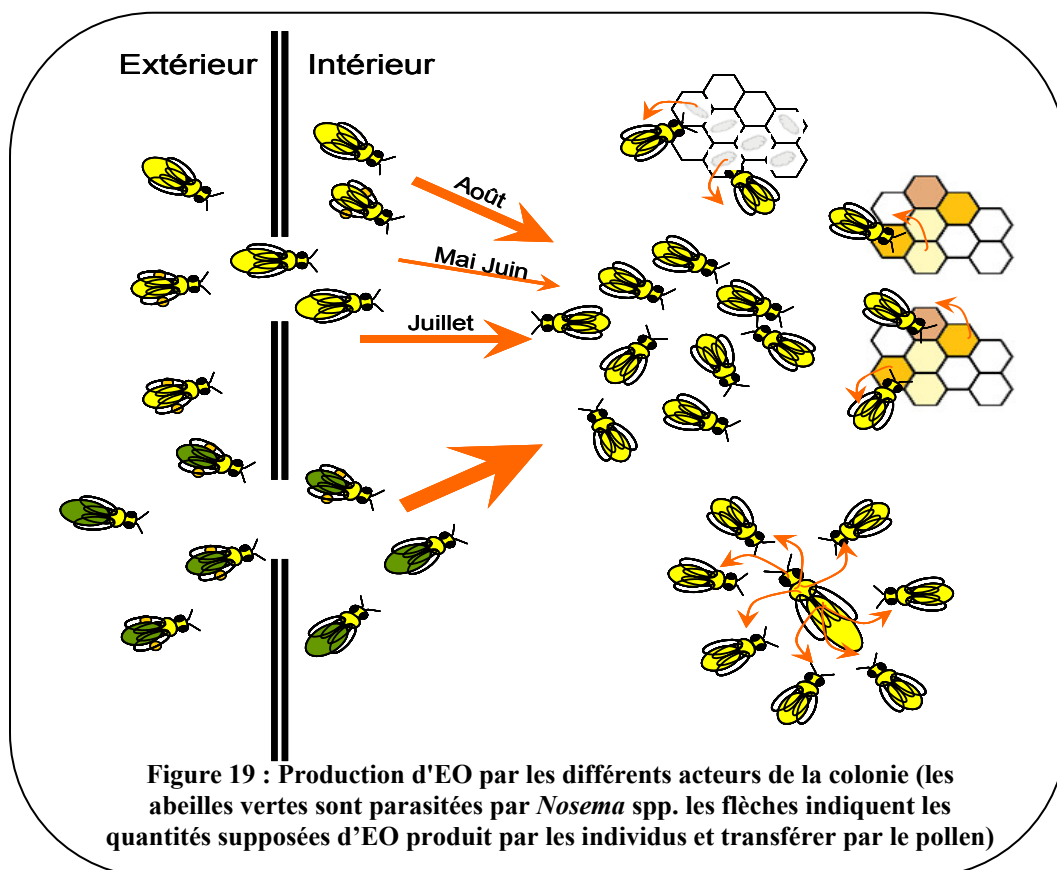
Seuil de réponse

Les différents individus peuvent avoir des seuils de réponse distincts (Robinson, 1992) aux différentes concentrations de phéromones. Tout au long de leur vie, les insectes sociaux sont en contact de différentes phéromones qui peuvent inciter l'exécution de tâches précises. Il est probable que chaque ouvrière effectue une tâche précise en fonction de sa réponse aux stimuli (phéromone) liés à la tâche (Robinson, 1992). Les individus changent de tâches en fonction des besoins correspondant à une tâche précise. Si le stimuli associé à cette tâche dépasse le seuil de réponse de l'ouvrière, alors elle exécutera cette tâche (Robinson, 1992).

Production et variation du signal

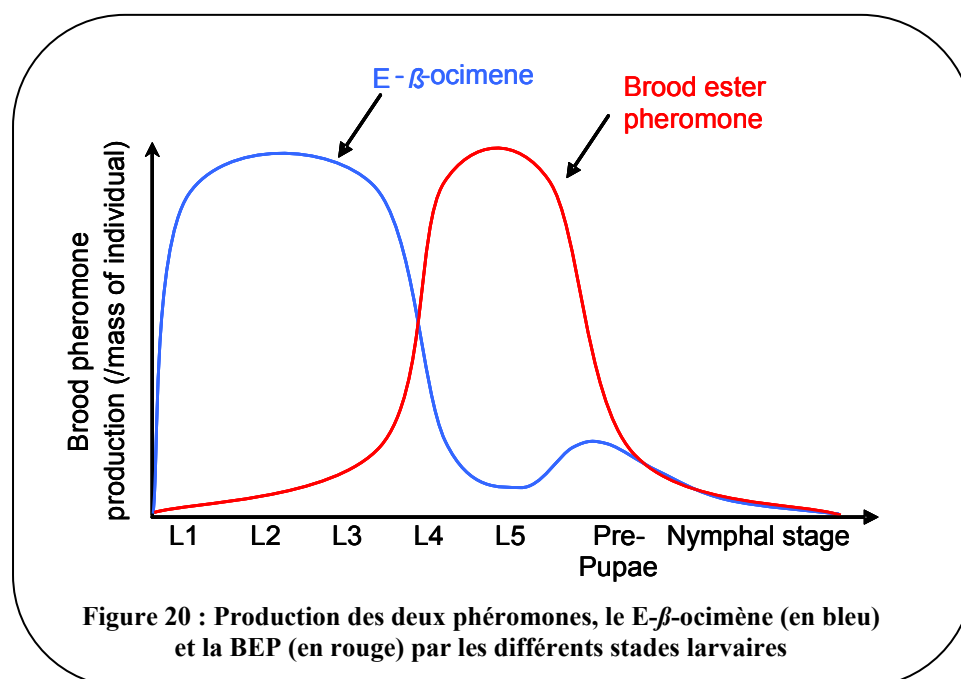
La production de l'EO, qui est une molécule inhibant la régulation de la maturation comportementale des abeilles, varie fortement sous différentes contraintes (fig. 19). Notre travail sur l'EO montre que, malgré des maturations comportementales différentes, les deux races d'abeilles domestiques les plus éloignées génétiquement (*Apis mellifera mellifera* et *ligustica*) (Whitfield *et al.*, 2006a) présentent la même production d'EO. Cette production suit une dynamique saisonnière, et peut être également modifiée par un parasite : le champignon *Nosema* spp. Il reste maintenant à savoir si les ouvrières sont sensibles à ces variations d'EO et ajustent leurs maturations comportementales en fonction des différentes concentrations d'EO dans le nid.

Les variations de production d'EO sont perçues dans la colonie par les différents individus, les différentes castes. Comme les individus ne présentent pas les mêmes seuils de réponse aux phéromones (Kocher *et al.*, 2010; Pham-Delègue *et al.*, 1993), les individus de la colonie répondront différemment à un faible ou un fort taux d'EO. Un faible taux d'EO dans la colonie engendre une maturation comportementale des ouvrières « normale » ou accélérée, par contre de forts taux d'EO (10000 butineuses équivalent, 2.1mg d'EO) (Leoncini *et al.*, 2004b) ralentissent le développement comportemental des abeilles. Ces variations d'EO sont un indicateur des besoins en nourrices dans la colonie selon l'abondance des ressources extérieures à la ruche.



Mais que peut engendrer une surproduction d'EO dans la colonie ? Nos études préliminaires (non publiées dans cette thèse) montrent que de très forts taux d'EO (10000 butineuses parasitées par *Nosema* spp. équivalent, 10mg d'EO) dans la colonie engendrent un dysfonctionnement du rôle de l'EO, les abeilles ont un développement comportemental plus rapide au lieu d'avoir une maturation comportementale ralentie. Ces résultats indiquent que les abeilles sont sensibles aux variations de concentrations en phéromones dans la colonie et qu'un changement excessif de la production d'une phéromone perturbe l'équilibre phéromonal de la colonie et désoriente sa structure.

Les variations des productions phéromonales dans la colonie peuvent aussi être dues à différentes demandes de la part des individus émetteurs de la colonie. Le couvain émet deux composés phéromonaux différents du point de vue de leur volatilité. Une larve va d'abord produire en quantité du E- β -ocimène les 3 premiers jours de sa vie puis elle va ensuite produire la BEP durant ces deux derniers stades larvaires (Fig. 20).



En produisant différents composés, le couvain affecte différents individus du nid. Les larves (jeunes et âgées) inhibent l'activation des ovaires des ouvrières et, en même temps chaque groupe signale ses besoins spécifiques aux ouvrières.

Les jeunes et vieilles larves n'ont pas les mêmes besoins nutritifs (Winston, 1987), les jeunes larves sont visitées et nourries par les nourrices moins souvent que les larves plus âgées (Brodtschneider, Crailsheim, 2010; Schmickl, Crailsheim, 2002). Les jeunes larves nécessitent

moins de nourrices et favorisent le butinage en accélérant la maturation comportementale des ouvrières en émettant du E- β -ocimène ; à l'inverse, les larves âgées sollicitent plus les nourrices en retardant leur développement comportemental par l'émission de la BEP (Le Conte *et al.*, 2001). De plus, une colonie sans approvisionnement en pollen maintient l'élevage de son couvain pendant un temps bref ; les jeunes larves, chez lesquelles peu d'investissement énergétique a été réalisé, sont cannibalisées et participent à l'apport de protéines aux ouvrières pour terminer l'élevage des larves plus âgées (Brodschneider, Crailsheim, 2010; Schmickl, Crailsheim, 2001; Schmickl, Crailsheim, 2002). Les jeunes larves doivent alors favoriser le butinage pour maintenir un taux en pollen adéquat pour l'expansion et l'entretien du couvain.

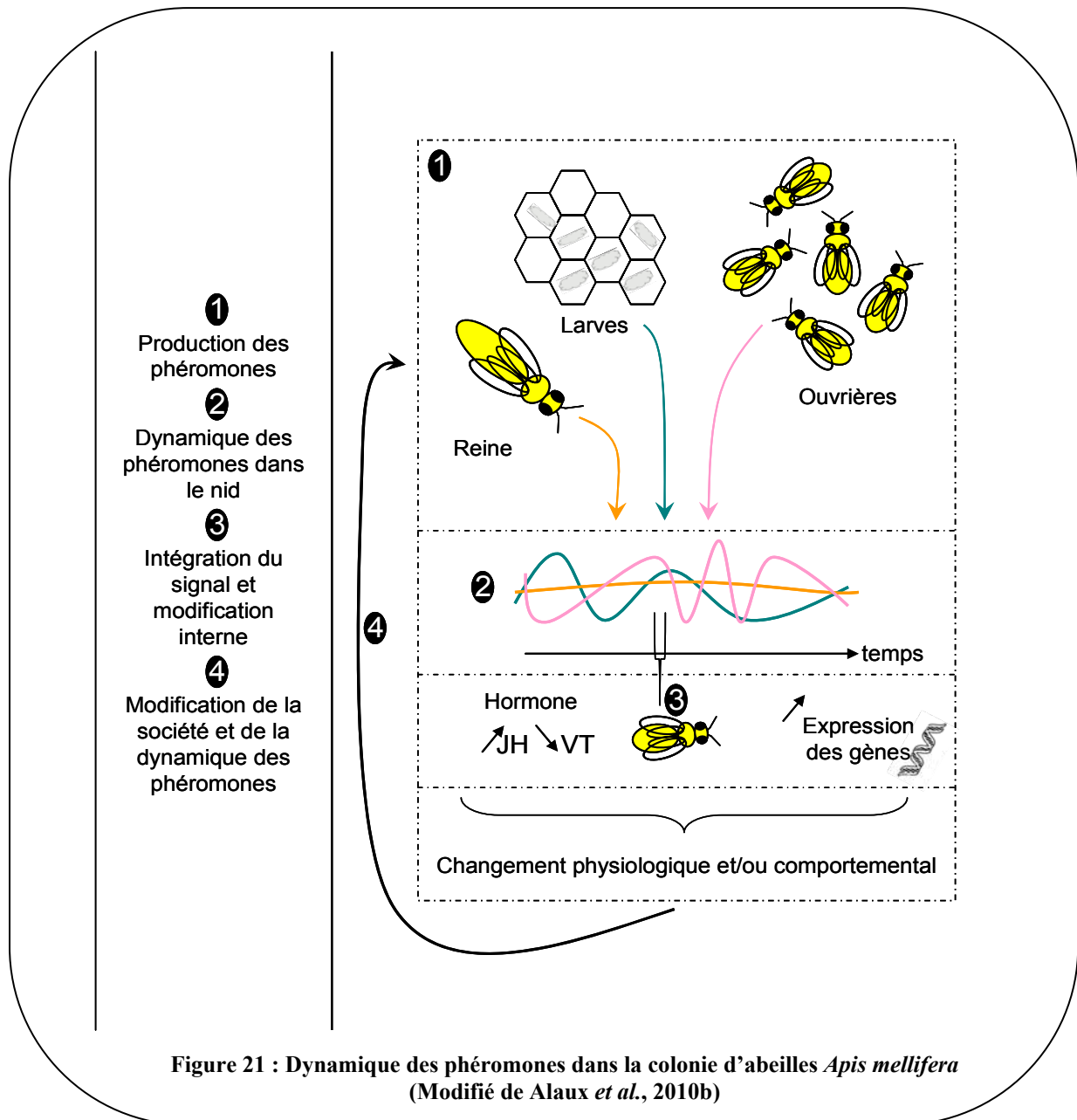
Selon leur âge, les larves ont différents besoins et l'exprimeront à travers l'émission de différentes concentrations de phéromones, en fonction desquelles la colonie s'adaptera pour optimiser le soin au couvain.

Le système de communication des abeilles est sans doute plus complexe que précédemment décrit par les scientifiques. Quelques unes des substances produites par les abeilles sont un signal de base de ce langage chimique, ces signaux sont émis en même quantité dans la colonie, comme la QMP, et d'autres phéromones permettent d'ajuster la colonie aux conditions du nid et aux conditions environnementales comme par exemple l'EO (Alaux *et al.*, 2010b) (Fig. 21).

Ce langage phéromonal complexe représenté sur la figure 21 est basé sur:

- Une grande diversité de phéromones produites par les différentes castes.
- Une production dynamique de phéromones. Cette dynamique dépend du nombre d'individus qui secrète la phéromone. La reine semble être le seul individu de la colonie qui produit une quantité de QMP constante, mais sa transmission est affectée par le nombre d'individus dans la colonie et engendre des variations dans les réponses des individus (Winston *et al.*, 1991).
- Une réponse aux phéromones différente selon les individus. A la réception des différentes phéromones, les individus ayant différents seuils de réponse en fonction de leur âge (Pham-Delègue *et al.*, 1993) et de leur génétique (Kocher *et al.*, 2010; Pankiw *et al.*, 1994) répondent différemment.

- Une adaptation du système en fonction des réponses des individus. Les individus sensibles aux phéromones ont des réponses génomiques, physiologiques et comportementales, qui en retour ont une incidence sur la production de phéromones au niveau de la colonie.



Les ouvrières répondent aux différents stimuli, chaque abeille ou groupe d'abeilles répondent d'une manière différente à la dynamique des phéromones émises dans la ruche, ce qui modifie par la suite cette dynamique phéromonale. De plus, chaque composé phéromonal ne peut être efficace en soi, mais ensembles, ils permettent à la colonie de développer une «syntaxe» phéromonale complexe et précise, au cours du cycle de vie de la colonie (Alaux *et al.*, 2010b).

La syntaxe de la communication chimique de la colonie d'abeilles, singularisée par sa complexité (nombre de phéromones, redondance, transmission, réception, contexte, dose, synergie...), semble être la marque des phéromones d'insectes sociaux, qui les distingue des phéromones d'insectes non sociaux. La communication chimique est un système complexe, avec des propriétés dynamiques, qui nécessite une approche globale et systémique (Slessor *et al.*, 2005a).

II Perspectives de travail

Pour l'EO et d'autres phéromones en général (par exemple le E- β -ocimène), l'étude des seuils de réponse précis des ouvrières à différentes concentrations phéromonales permettrait de comprendre précisément si la colonie s'adapte aux variations de production des phéromones. Nos résultats préliminaires (non publiés dans cette thèse) montrent une accélération de la maturation comportementale des abeilles en présence de très fortes doses d'EO. La société d'abeilles répond aux variations d'EO mais il est nécessaire d'affiner la dose réponse à cette molécule dans la colonie, pour mieux interpréter les changements de production de l'EO saisonnier et ceux dus au parasite *Nosema* spp.

Aujourd'hui, les chercheurs commencent à relier le système de communication avec les mortalités des colonies d'abeilles. Par exemple, nos résultats sur l'EO et le *Nosema* spp. permettent d'associer le CCD à la communication chimique. La cause de la perte d'abeilles due au CCD pourrait-être liée à une altération de la communication chimique. D'après notre étude, *Nosema* spp. augmente la production d'EO chez les abeilles infectées dans la colonie. Cette production très élevée d'EO semble accélérer le développement comportemental des abeilles, les abeilles deviendraient donc butineuses plus vite. La ruche se viderait de ses abeilles puisque la maturation comportementale ne prend que quelques jours (Robinson, 2002; Schulz *et al.*, 1998). D'autres études complémentaires sont en cours sur l'impact de pesticides et des maladies sur la communication chimique des ouvrières et de la reine. La compréhension du système de communication chimique permet de mieux comprendre les dysfonctionnements qui peuvent exister dans la colonie.

Pour comprendre la communication chimique de la reine, nous essayons de rechercher les molécules, émises par les reines démandibulées, responsables des effets incitateurs et modificateurs sur les ouvrières. Des résultats préliminaires sont en cours d'analyse sur les

molécules présentes chez ces reines démandibulées mais pour l'instant, aucun résultat concret n'a pu être obtenu. L'étude des effets d'extraits chimiques de reines démandibulées sur le comportement et la physiologie des ouvrières semble être une solution plus adaptée pour identifier les molécules royales susceptibles d'avoir un rôle biologique dans la colonie.

D'après les effets du E- β -ocimène dans la colonie (castration chimique et modification de la maturation des ouvrières), nous avons besoin d'étudier l'impact de cette phéromone sur la modification des gènes et des hormones des ouvrières et notamment l'impact du E- β -ocimène sur la JH et sur la Vg, hormones associées à la maturation comportementale des abeilles. Le E- β -ocimène pourrait modifier les taux de JH et Vg des ouvrières, en augmentant les taux de JH et réduisant les taux de Vg des abeilles.

Au vu des effets pléiotropiques des phéromones, il est probable que le E- β -ocimène ait aussi des effets incitateurs sur les ouvrières. La volatilité de cette phéromone nous a permis de tester ses effets modificateurs, mais ses effets incitateurs sont peut être plus difficiles à tester si la volatilité du composé n'est pas maîtrisée. Si, comme nous le suggérons, les larves jeunes et âgées ont des signaux précis pour leur nutrition, le E- β -ocimène pourrait induire le nourrissage par la gelée royale des jeunes larves, et la BEP induirait le nourrissage par la bouillie larvaire pour les larves âgées.

Aujourd'hui, pour mieux comprendre la communication chimique chez l'abeille, une analyse des différentes phéromones dans une ruche à un temps précis est nécessaire. Connaître chaque taux de phéromones dans la ruche à un temps déterminé permettrait de mieux comprendre les actions entreprises par les différents groupes d'ouvrières en réponse à ces différentes concentrations de phéromones à ce temps donné.

De nombreuses études sur l'identification de nouvelles phéromones, la caractérisation des seuils de détection des phéromones, la dynamique des phéromones dans le nid, ou les synergies entre phéromones, sont nécessaires pour comprendre ce système de communication. En outre, les études récentes sur les effets des phéromones sur les gènes et les hormones des abeilles améliorent la compréhension de ce système de communication.

La recherche sur la communication chez les insectes sociaux révèle la potentialité des découvertes fascinantes qui peuvent être réalisées pour mieux comprendre ces sociétés si complexes. L'étude de la communication chimique présente fréquemment de nouveaux résultats chez l'abeille, sur la compréhension des phéromones mais aussi des autres systèmes

de communication comme le *piping signal*, le *buzz signal* (Nieh, 2010; Rangel *et al.*, 2010), chez les fourmis où la première phéromone royale modificatrice vient d'être identifiée (Holman *et al.*, 2010) et chez les termites où une phéromone de reconnaissance des œufs a été identifiée (Matsuura *et al.*, 2007).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Alaux C, Brunet JL, Dussaubat C, *et al.* (2010a) Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **12**, 774-782.
- Alaux C, Le Conte Y, Adams HA, *et al.* (2009) Regulation of brain gene expression in honey bees by brood pheromone. *Genes, Brain and Behavior* **8**, 309-319.
- Alaux C, Maisonnasse A, Le Conte Y (2010b) Pheromones in a Superorganism: From Gene to Social Regulation. *Vitamins & Hormones* **83**, 401-423.
- Alaux C, Robinson GE (2007) Alarm Pheromone Induces Immediate-Early Gene Expression and Slow Behavioral Response in Honey Bees. *Journal of Chemical Ecology* **33**, 1346-1350.
- Amdam GV, Csondes A, Fondrk MK, Page RE, Jr. (2006) Complex social behaviour derived from maternal reproductive. *Nature* **439**, 76-78.
- Amdam GV, Norberg K, Fondrk MK, Page RE, Jr. (2004) Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 11350-11355.
- Amdam GV, Norberg K, Hagen A, Omholt SW (2003) Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1799-1802.
- Amdam GV, Omholt SW (2003) The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **223**, 451-464.
- Amdam GV, Rueppell O, Fondrk MK, Page RE, Nelson CM (2009) The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*). *Experimental Gerontology* **44**, 467-471.
- Amdam GV, Seehuus SC (2006) Order, Disorder, Death: Lessons from a Superorganism. *Advances in Cancer Research*, **95**, 31-60.
- Ament SA, Corona M, Pollock HS, Robinson GE (2008) Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4226-4231.
- Ament SA, Wang Y, Robinson GE (2010) Nutritional regulation of division of labor in honey bees: toward a systems biology perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **5**, 556-576.
- Arnold G, Le Conte Y, Trouiller J, *et al.* (1994) Inhibition of worker honeybee ovaries development by a mixture of fatty acid esters from larvae. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* **317**, 511-515.
- Barbier J, Lederer E (1960) Structure chimique de la substance royale de la reine d'abeille (*Apis mellifera* L.). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* **251**, 1131-1135.
- Bell WJ, Carde RT (1984) *Chemical Ecology of Insects*, W. J. Bell and R. T. Carde edn. Chapman and Hall, London.
- Ben-Shahar Y, Dudek NL, Robinson GE (2004) Phenotypic deconstruction reveals involvement of manganese transporter malvolio in honey bee division of labor. *Journal of Experimental Biology* **207**, 3281-3288.
- Ben-Shahar Y, Robichon A, Sokolowski MB, Robinson GE (2002) Influence of Gene Action Across Different Time Scales on Behavior. *Science* **296**, 741-744.

- Beshers SN, Fewell JH (2001) Models of division of labor in social insects. *Annual Review of Entomology* **46**, 413-440.
- Bloch G, Wheeler DE, Robinson GE (2002) Endocrine influences on the organization of insect societies. In: *Hormones, Brain, and Behavior* (ed. D.W. Pfaff APA, A.M. Ettgen, S.E. Fahrbach and R.T. Rubin), p. 195–237. Academic Press, San Diego.
- Blomquist GJ, Bagnères AG (2010) *Insects Hydrocarbons* Cambridge University Press, New York.
- Boch R, Shearer DA, Stone BC (1962) Identification of Iso-Amyl Acetate as an Active Component in the Sting Pheromone of the Honey Bee. *Nature* **195**, 1018-1020.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **7**, 248-254.
- Breed MD, Guzman-Novoa E, Hunt GJ (2004) Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annual Review of Entomology* **49**, 271-298.
- Brillet C, Robinson GE, Bues R, Le Conte Y (2002) Racial differences in division of labor in colonies of the honey bee (*Apis mellifera*). *Ethology* **108**, 115-126.
- Brodschneider R, Crailsheim K (2010) Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **41**, 278-294.
- Brossut R (1996) *Phéromones : la communication chimique chez les animaux*, CNRS Editions edn., Paris.
- Butler CG, Callow RK, Johnston NC (1962) The Isolation and Synthesis of Queen Substance, 9-oxododec-trans-2-enoic Acid, a Honeybee Pheromone. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* **155**, 417-432.
- Butler CG, Faurey EM (1963) The role of the queen in preventing oogenesis in worker honeybees. *Journal of Apicultural Research*, **2**, 14-18.
- Calderone NW (1998) Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Apidologie* **29**, 127-158.
- Calderone NW, Page RE (1992) Effects of interactions among genotypically diverse nestmates on task specialization by foraging honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **30**, 219-226.
- Chaline N, Sandoz J-C, Martin SJ, Ratnieks FLW, Jones GR (2005) Learning and Discrimination of Individual Cuticular Hydrocarbons by Honeybees (*Apis mellifera*). *Chemical Senses* **30**, 327-335.
- Cornwell RE, Boothroyd L, Burt DM, *et al.* (2004) Concordant preferences for opposite-sex signals? Human pheromones and facial characteristics. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **271**, 635-640.
- Crailsheim K, Schneider LHW, Hrassnigg N, *et al.* (1992) Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology* **38**, 409-419.
- Dampney JR, Barron AB, Oldroyd BP (2004) Measuring the cost of worker reproduction in honeybees: work tempo in an "anarchic" line. *Apidologie* **35**, 83-88.
- Dani FR, Jones GR, Corsi S, *et al.* (2005) Nestmate Recognition Cues in the Honey Bee: Differential Importance of Cuticular Alkanes and Alkenes. *Chemical Senses* **30**, 477-489.
- Decourtye A, Armengaud C, Renou M, *et al.* (2004) Imidacloprid impairs memory and brain metabolism in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **78**, 83-92.

- DeGrandi-Hoffman G, Gilley D, Hooper J (2007) The influence of season and volatile compounds on the acceptance of introduced European honey bee (*Apis mellifera*) queens into European and Africanized colonies. *Apidologie* **38**, 230-237.
- Denison R, Raymond-Delpech V (2008) Insights into the molecular basis of social behaviour from studies on the honeybee, *Apis mellifera*. *Invertebrate Neuroscience* **8**, 1-9.
- Deseyn J, Billen J (2005) Age-dependent morphology and ultrastructure of the hypopharyngeal gland of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* **36**, 49-57.
- Desneux N, Decourtaye A, Delpuech JM (2007) The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. *Annual Review of Entomology* **52**, 81-106.
- Dietemann V, Neumann P, Härtel S, Pirk CWW, Crewe RM (2007) Pheromonal dominance and the selection of a socially parasitic honeybee worker lineage (*Apis mellifera capensis* Esch.). *Journal of Evolutionary Biology* **20**, 997-1007.
- Dietemann V, Pflugfelder J, Hartel S, Neumann P, Crewe RM (2006) Social parasitism by honeybee workers (*Apis mellifera capensis* Esch.): evidence for pheromonal resistance to host queen's signals. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**, 785-793.
- Dreller C, Page RE, Jr., Fondrk MK (1999) Regulation of pollen foraging in honeybee colonies: effects of young brood, stored pollen, and empty space. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **45**, 227-233.
- Dussaubat C, Maisonnasse A, Alaux C, et al. (2010) *Nosema* spp. Infection Alters Pheromone Production in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology* **36**, 522-525.
- Dyer FC (2003) The biology of the dance language. *Annual Review of Entomology* **47**, 917-949.
- Engelmann F (1983) Vitellogenesis controlled by juvenile hormone. In: *Endocrinology of Insects* (ed. Laufer RGHDaH), p. 259-270. Alan R. Liss, New York.
- Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC, Morales-Montor J (2005) Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation? *Trends in Parasitology* **21**, 588-593.
- Fewell JH, Winston ML (1992) Colony state and regulation of pollen foraging in the honey bee, *Apis mellifera* L. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **30**, 387-393.
- Fischer P, Grozinger CM (2008) Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* **95**, 723-729.
- Fluri P, Luscher M, Wille H, Gerig L (1982) Changes in weight of pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology* **28**, 61-68.
- Free JB (1965) The allocation of duties among worker honeybees. *Symposium of the Zoological Society of London* **14**, 39-59.
- Free JB (1987) *Pheromones of social bees* Chapman and Hall, London UK.
- Free JB, Winder ME (1983) Brood recognition by honeybee (*Apis mellifera*) workers. *Animal Behaviour* **31**, 539-545.
- Frisch Kv (1967) *The dance language and orientations of bees*, Harvard Univ. Press edn., Cambridge.
- Gary NE (1961a) Mandibular gland extirpation in living queen and worker honey bee (*Apis mellifera* L.). *Annals of the Entomological Society of America* **54**, 529-531.
- Gary NE (1961b) Queen honey bee attractiveness as related to mandibular gland secretion. *Science* **133**, 1479-1480.
- Gary NE (1962) Chemical mating attractants in the queen honey bee. *Science* **136**, 773-774.
- Gilley DC, DeGrandi-Hoffman G, Hooper JE (2006) Volatile compounds emitted by live European honey bee (*Apis mellifera* L.) queens. *Journal of Insect Physiology* **52**, 520-527.

- Giray T, Robinson GE (1994) Effects of intracolony variability in behavioral development on plasticity of division of labor in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **35**, 13-20.
- Giray T, Robinson GE (1996) Common endocrine and genetic mechanisms of behavioral development in male and worker honey bees and the evolution of division of labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 11718-11722.
- Grozinger CM, Robinson GE (2007) Endocrine modulation of a pheromone-responsive gene in the honey bee brain. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **193**, 461-470.
- Grozinger CM, Sharabash NM, Whitfield CW, Robinson GE (2003) Pheromone-mediated gene expression in the honey bee brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl 2**, 14519-14525.
- Guidugli KR, Nascimento AM, Amdam GV, *et al.* (2005) Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* **579**, 4961-4965.
- Haydak MH (1970) Honey Bee Nutrition. *Annual Review of Entomology* **15**, 143-156.
- Heinze J (2004) Reproductive Conflict in Insect Societies. *Advances in the Study of Behavior* **34**, 1-57.
- Heinze J, d'Ettorre P (2009) Honest and dishonest communication in social Hymenoptera. *Journal of Experimental Biology* **212**, 1775-1779.
- Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A (2007) Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *Journal of Invertebrate Pathology* **94**, 211-217.
- Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, *et al.* (2008) How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *Environmental Microbiology* **10**, 2659-2669.
- Holman L, Jorgensen CG, Nielsen J, d'Ettorre P (2010) Identification of an ant queen pheromone regulating worker sterility. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Hoover SER, Keeling CI, Winston ML, Slessor KN (2003) The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften* **90**, 477-480.
- Hoover SER, Oldroyd BP, Wossler TC, Winston ML (2005a) Anarchistic queen honey bees have normal queen mandibular pheromones. *Insectes Sociaux* **52**, 6-10.
- Hoover SER, Winston ML, Oldroyd BP (2005b) Retinue attraction and ovary activation: responses of wild type and anarchistic honey bees (*Apis mellifera*) to queen and brood pheromones. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **59**, 278-284.
- Hrassnigg N, Crailsheim K (1998) Adaptation of hypopharyngeal gland development to the brood status of honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Insect Physiology* **44**, 929-939.
- Huang ZY, Otis GW (1989) Factors determining hypopharyngeal gland activity of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **36**, 264-276.
- Huang ZY, Otis GW (1991) Inspection and feeding of larvae by worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): effect of starvation and food quality. *Journal of Insect Behavior* **4**, 305-317.
- Huang Z-Y, Plettner E, Robinson GE (1998) Effects of social environment and worker mandibular glands on endocrine-mediated behavioral development in honey bees. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **183**, 143-152.

- Huang ZY, Robinson GE (1992) Honeybee colony integration: worker-worker interactions mediate hormonally regulated plasticity in division of labor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 11726-11729.
- Huang ZY, Robinson GE (1996) Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**, 147-158.
- Hunt GJ, Wood KV, Guzman-Novoa E, *et al.* (2003) Discovery of 3-Methyl-2-Buten-1-Yl Acetate, a New Alarm Component in the Sting Apparatus of Africanized Honeybees. *Journal of Chemical Ecology* **29**, 453-463.
- Ihle KE, Page REJ, Frederick K, Fondrk MK, Amdam GV (2010) Genotype effect on regulation of behaviour by vitellogenin supports reproductive origin of honeybee foraging bias. *Animal Behaviour* **79**, 1001-1006.
- Jassim O, Huang ZY, Robinson GE (2000) Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology* **46**, 243-249.
- Jay SC (1963) The development of honeybees in their cells. *Journal of Apicultural Research* **2**, 117-134.
- Jay SC (1968) Factors influencing ovary development of worker honeybees under natural conditions. *Canadian journal of zoology* **46**, 345-347.
- Johnson BR (2003) Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **270**, 147-152.
- Johnson BR (2008a) Global information sampling in the honey bee. *Naturwissenschaften* **95**, 523-530.
- Johnson BR (2008b) Within-nest temporal polyethism in the honey bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **62**, 777-784.
- Johnson BR (2010) Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 305-316.
- Kaatz HH, Hildebrandt H, Engels W (1992) Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **162**, 588-592.
- Karlson P, Luscher M (1959) Pheromones: a New Term for a Class of Biologically Active Substances. *Nature* **183**, 55-56.
- Katzav-Gozansky T (2006) The evolution of honeybee multiple queen-pheromones - a consequence of a queen-worker arms race? *Brazilian Journal of Morphological Sciences* **23**, 287-294.
- Katzav-Gozansky T, Boulay R, Soroker V, Hefetz A (2004) Queen-signal modulation of worker pheromonal composition in honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* **271**, 2065-2069.
- Katzav-Gozansky T, Soroker V, Hefetz A (2002a) Evolution of worker sterility in honey bees: egg-laying workers express queen-like secretion in Dufour's gland. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **51**, 588-589.
- Katzav-Gozansky T, Soroker V, Hefetz A (2002b) Honeybees Dufour's gland - idiosyncrasy of a new queen signal. *Apidologie* **33**, 525-537.
- Katzav-Gozansky T, Soroker V, Ibarra F, Francke W, Hefetz A (2001) Dufour's gland secretion of the queen honeybee (*Apis mellifera*): an egg discriminator pheromone or a queen signal? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **51**, 76-86.
- Katzav-Gozansky TK, Soroker V, Hefetz A (1997) The biosynthesis of Dufour's gland constituents in queens of the honeybee (*Apis mellifera*). *Invertebrate Neuroscience* **3**, 239-243.

- Keeling CI, Slessor KN (2005) A scientific note on the aliphatic esters in queen honey bees. *Apidologie* **36**, 559-560.
- Keeling CI, Slessor KN, Higo HA, Winston ML (2003) New components of the honey bee (*Apis mellifera* L.) queen retinue pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4486-4491.
- Keller L, Nonacs P (1993) The role of queen pheromones in social insects: queen control or queen signal? *Animal Behaviour* **45**, 787-794.
- Kocher S, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM (2008) Genomic analysis of post-mating changes in the honey bee queen (*Apis mellifera*). *BMC Genomics* **9**, 232.
- Kocher SD, Ayroles JF, Stone EA, Grozinger CM (2010) Individual Variation in Pheromone Response Correlates with Reproductive Traits and Brain Gene Expression in Worker Honey Bees. *PLoS ONE* **5**, e9116.
- Kocher SD, Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM (2009) Queen reproductive state modulates pheromone production and queen-worker interactions in honeybees. *Behavioral Ecology* **20**, 1007-1014.
- Koeniger N, Abelsfelder H (1985) New aspects of brood care in the honeybee. *Apimondia*, 106-108.
- Koeniger N, Veith HJ (1983a) Glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate, a brood pheromone of the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Experientia* **39**, 1051-1052.
- Koeniger N, Veith HJ (1983b) Identification of triglyceride (glyceryl-1,2-dioleate-3-palmitate) as a brood pheromone of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **14**, 204-210.
- Kolmes SA, Winston ML, Fergusson LA (1989) The division of labor among worker honey bees (Hymenoptera: Apidae): the effects of multiple patrines. *Journal of the Kansas Entomological Society* **62**, 80-95.
- Korst P, Velthuis H (1982) The nature of trophallaxis in honeybees. *Insectes Sociaux* **29**, 209-221.
- Kropacova S, Haslbachova H (1969) The development of ovaries in worker honeybees in a queenright colony. *Journal of Apicultural Research* **8**, 57-64.
- Kropacova S, Haslbachova H (1970) The development of ovaries in worker honeybees in a queenright colonies examined before and after swarming. *Journal of Apicultural Research* **9**, 65-70.
- Kropacova S, Haslbachova H (1971) The influence of queenlessness and of unsealed brood on the development of ovaries in worker honeybees. *Journal of Apicultural Research* **10**, 57-61.
- Laidlaw JHH, Page RE (1997) *Queen rearing and bee breeding* Wicwas Press, Cheshire.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B (1990) Identification of a brood pheromone in honeybees. *Naturwissenschaften* **77**, 334-336.
- Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, et al. (1989) Attraction of the Parasitic Mite *Varroa* to the Drone Larvae of Honey Bees by Simple Aliphatic Esters. *Science* **245**, 638-639.
- Le Conte Y, Hefetz A (2008) Primer Pheromones in Social Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **53**, 523-542.
- Le Conte Y, Mohammedi A, Robinson GE (2001) Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* **268**, 163-168.
- Le Conte Y, Sreng L, Poitout SH (1995a) Brood pheromone can modulate the feeding behavior of *Apis mellifera* workers (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **88**, 798-804.
- Le Conte Y, Sreng L, Sacher N, et al. (1995b) Chemical recognition of queen cells by honey bee workers *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Chemoecology* **5/6**, 6-12.

- Le Conte Y, Sreng L, Trouiller J (1994) The recognition of larvae by worker honeybees. *Naturwissenschaften* **81**, 462-465.
- Ledoux MN, Winston ML, Higo H, *et al.* (2001) Queen and pheromonal factors influencing comb construction by simulated honey bee (*Apis mellifera* L.) swarms. *Insectes Sociaux* **48**, 14-20.
- Leoncini I, Crauser D, Robinson GE, Le Conte Y (2004a) Worker-worker inhibition of honey bee behavioural development independent of queen and brood. *Insectes Sociaux* **51**, 392-394.
- Leoncini I, Le Conte Y, Costagliola G, *et al.* (2004b) Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17559-17564.
- Lindauer M (1952) Contribution to the question of division of labour in the honeybee colony. *Z. Vergl. Physiol.* **34**, 299-345.
- Maisonnasse A, Lenoir JC, Costagliola G, *et al.* (2009) A scientific note on E- β -ocimene, a new volatile primer pheromone that inhibits worker ovary development in honey bees. *Apidologie* **40**, 562-564.
- Malka O, Karunker I, Yeheskel A, Morin S, Hefetz A (2009a) The gene road to royalty - differential expression of hydroxylating genes in the mandibular glands of the honeybee. *FEBS Journal* **276**, 5481-5490.
- Malka O, Katzav-Gozansky T, Hefetz A (2009b) Uncoupling fertility from fertility-associated pheromones in worker honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **55**, 205-209.
- Martin SJ, Beekman M, Wossler TC, Ratnieks FLW (2002) Parasitic Cape honeybee workers, *Apis mellifera capensis*, evade policing. *Nature* **415**, 163-165.
- Matsuura K, Tamura T, Kobayashi N, Yashiro T, Tatsumi S (2007) The Antibacterial Protein Lysozyme Identified as the Termite Egg Recognition Pheromone. *PLoS ONE* **2**, e813.
- McFarland D (1985) *Animal behaviour: psychobiology, ethology and evolution* Pitman, London.
- Michener CD (1969) Comparative Social Behavior of Bees. *Annual Review of Entomology* **14**, 299-342.
- Michener CD (1974) *The social behavior of the bees* Harvard University Press, Cambridge.
- Mohammedi A, Crauser D, Paris A, Le Conte Y (1996) Effect of a brood pheromone on honeybee hypopharyngeal glands. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III Sciences de la Vie* **319**, 769-772.
- Mohammedi A, Paris A, Crauser D, Le Conte Y (1998) Effect of aliphatic esters on ovary development of queenless bees (*Apis mellifera* L.). *Naturwissenschaften* **85**, 455-458.
- Morse RA, Boch R (1971) Pheromone Concert in Swarming Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America* **64**, 1414-1417.
- Naumann K (1991) Grooming behaviors and the translocation of queen mandibular gland pheromone on worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **22**, 523-531.
- Naumann K, Winston ML, Slessor KN (1993) Movement of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen mandibular gland pheromone in populous and unpopulous colonies. *Journal of Insect Behavior* **6**, 211-223.
- Naumann K, Winston ML, Slessor KN, Prestwich GD, Webster FX (1991) Production and transmission of honey bee queen (*Apis mellifera* L.) mandibular gland pheromone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **29**, 321-332.
- Nedel JO (1960) Morphologie und physiologie der mandibeldrüse einiger bienen-arten (Apidae). *Zoomorphology* **49**, 139-183.
- Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page RE, Jr., Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. *PLoS Biology* **5**, 673-677.

- Neumann P, Hepburn H, Radloff SE (2000) Modes of worker reproduction, reproductive dominance and brood cell construction in queenless honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Apidologie* **31**, 479-486.
- Nieh JC (2010) A Negative Feedback Signal That Is Triggered by Peril Curbs Honey Bee Recruitment. *Current Biology* **20**, 310-315.
- Nowogrodzki R (1984) Division of labour in the honey colony : a review. *Bee World* **65**, 109-116.
- Oldroyd BP, Halling L, Rinderer TE (1999) Development and behaviour of anarchistic honeybees. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* **266**, 1875-1878.
- Oldroyd BP, Smolenski AJ, Cornuet JM, Crozier RH (1994) Anarchy in the beehive. *Nature* **371**, 749.
- Oldroyd BP, Wossler TC, Ratnieks FR (2001) Regulation of ovary activation in worker honey-bees (*Apis mellifera*): larval signal production and adult response thresholds differ between anarchistic and wild-type bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **50**, 366-370.
- Page RE, Jr., Amdam GV (2007) The making of a social insect: developmental architectures of social design. *BioEssays* **29**, 334-343.
- Page RE, Robinson GE (1991) The genetics of division of labour in honeybee colonies. *Advances in insect physiology* **23**, 117-169.
- Page RE, Robinson GE, Fondrk MK, Nasr ME (1995) Effects of Worker Genotypic Diversity on Honey Bee Colony Development and Behavior (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **36**, 387-396.
- Pain J (1961) Sur la phéromone des reines d'abeilles et ses effets physiologiques. *Annales de l'Abeille* **4**, 73-152.
- Pain J (1966) Nouveau modèle de cagettes expérimentales pour le maintien d'abeilles en captivité. *Annales de l'Abeille* **9**, 71-76.
- Pankiw T (2004a) Brood pheromone regulates foraging activity of honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **97**, 748-751.
- Pankiw T (2004b) Worker honey bee pheromone regulation of foraging ontogeny. *Naturwissenschaften* **91**, 178-181.
- Pankiw T (2007) Brood pheromone modulation of pollen forager turnaround time in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Behavior* **20**, 173-180.
- Pankiw T, Garza C (2007) Africanized and European honey bee worker ovarian follicle development response to racial brood pheromone extracts. *Apidologie* **38**, 156-163.
- Pankiw T, Huang Z-Y, Winston ML, Robinson GE (1998a) Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of Insect Physiology* **44**, 685-692.
- Pankiw T, Page RE, Jr., Fondrk MK (1998b) Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **44**, 193-198.
- Pankiw T, Roman R, Sagili RR, Zhu-Salzman K (2004) Pheromone-modulated behavioral suites influence colony growth in the honey bee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* **91**, 575-578.
- Pankiw T, Winston ML, Plettner E, et al. (1996) Mandibular gland components of European and Africanized honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **22**, 605-615.
- Pankiw T, Winston ML, Slessor KN (1994) Variation in worker response to honey bee (*Apis mellifera* L.) queen mandibular pheromone (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior* **7**, 1-15.

- Pankiw T, Winston ML, Slessor KN (1995) Queen attendance behavior of worker honey bees (*Apis mellifera* L.) that are high and low responding to queen mandibular pheromone. *Insectes Sociaux* **42**, 371-378.
- Pernal SF, Currie RW (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* **31**, 387-409.
- Peters L, Zhu-Salzman K, Pankiw T (2010) Effect of primer pheromones and pollen diet on the food producing glands of worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **56**, 132-137.
- Pham-Delègue MH, Trouiller J, Caillaud CM, Roger B, Masson C (1993) Effect of queen pheromone on worker bees of different ages: behavioural and electrophysiological responses. *Apidologie* **24**, 267-281.
- Pickett JA, Williams IH, Martin AP (1982) (Z)-11-eicosen-1-ol, an important new pheromonal component from the sting of the honey bee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae.). *Journal of Chemical Ecology* **8**, 163-175.
- Plettner E, Otis GW, Wimalaratne PDC, et al. (1997) Species- and caste-determined mandibular gland signals in honeybees (*Apis*). *Journal of Chemical Ecology* **23**, 363-377.
- Rachinsky A, Hartfelder K (1990) Corpora allata activity, a prime regulating element for caste-specific juvenile hormone titre in honey bee larvae (*Apis mellifera carnica*). *Journal of Insect Physiology* **36**, 189-194.
- Rangel J, Griffin S, Seeley TD (2010) An oligarchy of nest-site scouts triggers a honeybee swarm's departure from the hive. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 979-987.
- Rasmussen LEL, Lee TD, Roelofs WL, Zhang A, Daves GD (1996) Insect pheromone in elephants. *Nature* **379**, 684.
- Ratnieks FLW, Foster KR, Wenseleers T (2006) Conflict resolution in insect societies. *Annual Review of Entomology* **51**, 581-608.
- Ratnieks FLW, Visscher PK (1989) Worker policing in the honeybee. *Nature* **342**, 796-797.
- Ratnieks FLW, Wenseleers T (2008) Altruism in insect societies and beyond: voluntary or enforced? *Trends in Ecology & Evolution* **23**, 45-52.
- Richard F-J, Aubert A, Grozinger CM (2008) Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology* **6**, 50.
- Ribbands CR (1953) *The Behaviour and Social Life of Honeybees*, London.
- Robinson GE (1987) Regulation of honey bee age polyethism by juvenile hormone. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **20**, 329-338.
- Robinson GE (1992) Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **37**, 637-665.
- Robinson GE (2002) Genomics and Integrative Analyses of Division of Labor in Honeybee Colonies. *The American Naturalist* **160**, 160-172.
- Robinson GE, Fernald RD, Clayton DF (2008) Genes and Social Behavior. *Science* **322**, 896-900.
- Robinson GE, Page RE (1989) Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **24**, 317-323.
- Robinson GE, Vargo EL (1997) Juvenile hormone in adult eusocial hymenoptera: Gonadotropin and behavioral pacemaker. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**, 559-583.
- Rosch GA (1925) Untersuchungen über die Arbeitsteilung im Bienenstaat. I. Teil: Die Tätigkeiten im normalen Bienenstaate und ihre Beziehungen zum Alter der Arbeitsbienen. *Z. vergl. Physiol.* **2**, 571-631.

- Salvy M, Martin C, Bagnères AG, *et al.* (2001) Modifications of the cuticular hydrocarbon profile of *Apis mellifera* worker bees in the presence of the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* in brood cells. *Parasitology* **122**, 145-159.
- Schmickl T, Crailsheim K (2001) Cannibalism and early capping: strategy of honeybee colonies in times of experimental pollen shortages. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **187**, 541-547.
- Schmickl T, Crailsheim K (2002) How Honeybees (*Apis mellifera* L.) Change their Broodcare Behaviour in Response to Non-Foraging Conditions and Poor Pollen Conditions. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **51**, 415-425.
- Schulz DJ, Huang ZH, Robinson GE (1998) Effects of colony food shortage on behavioral development in honey bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **42**, 295-303.
- Schulz DJ, Robinson GE (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies: behaviorally related changes in the antennal lobes and age-related changes in the mushroom bodies. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **184**, 481-488.
- Schulz DJ, Robinson GE (2001) Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **187**, 53-61.
- Schulz DJ, Vermiglio MJ, Huang ZY, Robinson GE (2002) Effects of colony food shortage on social interactions in honey bee colonies. *Insectes Sociaux* **49**, 50-55.
- Seeley TD (1982) Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **11**, 287-293.
- Seeley TD (1985) *Honeybee ecology: a study of adaptation in social life* Princeton University Press, Princeton.
- Seeley TD (1995) *The wisdom of the hive. The social physiology of honey bee colonies* MA: Harvard University Press, Cambridge.
- Shearer DA, Boch R (1965) 2-Heptanone in the Mandibular Gland Secretion of the Honeybee. *nature* **206**, 530.
- Simon UE, Moritz RFA, Crewe RM (2001) The ontogenetic pattern of mandibular gland components in queenless worker bees (*Apis mellifera capensis*). *Journal of Insect Physiology* **47**, 735-738.
- Simpson J (1960) The functions of the salivary glands of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **4**, 109-121.
- Simpson J, Riedel IBM, Wilding N (1968) Invertase in the hypopharyngeal glands of the honey bee. *Journal of Apicultural Research* **7**, 29-36.
- Sinha S, Ling X, Whitfield CW, Zhai CX, Robinson GE (2006) Genome scan for cis-regulatory DNA motifs associated with social behavior in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16352-16357.
- Sladen FWL (1901) A scent organ in the bee. *British Bee Journal*, 142.
- Slessor KN, Kaminski L-A, King GGS, Borden JH, Winston ML (1988) Semiochemical basis of the retinue response to queen honey bees. *Nature* **332**, 354-356.
- Slessor KN, Kaminski LA, King GGS, Winston ML (1990) Semiochemicals of the honeybee queen mandibular glands. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 851-860.
- Slessor KN, Winston ML, Le Conte Y (2005a) Pheromone communication in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2731-2745.
- Smedal B, Brynøm M, Kreibich CD, Amdam GV (2009) Brood pheromone suppresses physiology of extreme longevity in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **212**, 3795-3801.

- Stabentheiner A, Kovac H, Brodschneider R (2010) Honeybee Colony Thermoregulation - Regulatory Mechanisms and Contribution of Individuals in Dependence on Age, Location and Thermal Stress. *PLoS ONE* **5**, e8967.
- Strauss K, Scharpenberg H, Crewe RM, *et al.* (2008) The role of the queen mandibular gland pheromone in honeybees (*Apis mellifera*): honest signal or suppressive agent? *Behavioral Ecology and Sociobiology* **62**, 1523-1531.
- Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE, Robinson GE (2000) Juvenile Hormone Paces Behavioral Development in the Adult Worker Honey Bee. *Hormones and Behavior* **37**, 1-14.
- Thom C, Gilley DC, Hooper J, Esch HE (2007) The scent of the waggle dance. *PLoS Biology* **5**, 1862-1867.
- Toth AL, Kantarovich S, Meisel AF, Robinson GE (2005) Nutritional status influences socially regulated foraging ontogeny in honey bees. *Journal of Experimental Biology* **208**, 4641-4649.
- Toth AL, Robinson GE (2005) Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour* **69**.
- Trouiller J, Arnold G, Le Conte Y, Masson C, Chappe B (1991) Temporal pheromonal and kairomonal secretion in the brood of honeybees. *Naturwissenschaften* **78**, 368-370.
- Trumbo ST, Huang ZY, Robinson GE (1997) Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **41**, 151-163.
- Tsuruda JM, Page RE (2009) The effects of young brood on the foraging behavior of two strains of honey bees (*Apis mellifera*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 161-167.
- VanEngelsdorp D, Evans JD, Saegerman C, *et al.* (2009) Colony Collapse Disorder: A Descriptive Study. *PLoS ONE* **4**, e6481.
- Velthuis HH (1970a) Ovarian development in *Apis mellifera* worker bees. *Entomologia experimentalis et applicata* **13**, 377-394.
- Velthuis HHW (1970b) Queen substances from the abdomen of the honey bee queen. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **70**, 210-221.
- Velthuis HHW, Van Es J (1964) Some functional aspects of the mandibular glands of the queen honeybee. *Journal of apicultural research* **3** (1), 11-16.
- Vergoz V, Schreurs HA, Mercer AR (2007) Queen pheromone blocks aversive learning in young worker bees. *Science* **317**, 384-386.
- Visscher PK (1996) Reproductive conflict in honey bees: a stalemate of worker egg-laying and policing. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**, 237-244.
- Wagener-Hulme C, Kuehn JC, Schulz DJ, Robinson GE (1999) Biogenic amines and division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* **184**, 471-479.
- Wang DI, Mofler FE (1970) The Division of Labor and Queen Attendance Behavior of Nosema-Infected Worker Honey Bees. *Journal of Economic Entomology* **63**, 1540-1541.
- Wanner KW, Nichols AS, Walden KKO, *et al.* (2007) A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14383-14388.
- Whiffler LA, Hepburn HR (1991) The queen in relation to wax secretion and comb building in honeybees. *Journal of Comparative Physiology A Sensory Neural and Behavioral Physiology* **169**, 209-214.
- Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, *et al.* (2006a) Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*. *Science* **314**.

- Whitfield CW, Ben-Shahar Y, Brillet C, *et al.* (2006b) Genomic dissection of behavioral maturation in the honey bee. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 16068-16075.
- Whitfield CW, Cziko AM, Robinson GE (2003) Gene expression profiles in the brain predict behavior in individual honey bees. *Science* **302**, 296-299.
- Whittaker RH, Feeny PP (1970) Allelochemicals: chemical interactions between plants. *Science* **171**, 757-770.
- Williams IH, Pickett JA, Martin AP (1982) Nasonov pheromone of the honeybee. *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Chemical Ecology* **8**, 567-574.
- Willis LG, Winston ML, Slessor KN (1990) Queen honey bee mandibular pheromone does not affect worker ovary development. *Canadian Entomologist* **122**, 1093-1099.
- Wilson EO (1970) Chemical communication within animal species. In: *Chemical ecology* (ed. Sondheimer E SJB), p. 133-155. Academic Press, New York.
- Wilson EO (1971) *The Insect Societies* Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Wilson EO, Bossert WH (1963) Chemical communication among animals. *Recent Progress In Hormone Research* **19**, 673-716.
- Winston ML (1987) *The biology of the honey bee* Harvard University Press, Cambridge USA.
- Winston ML, Higo HA, Colley SJ, Pankiw T, Slessor KN (1991) The role of queen mandibular pheromone and colony congestion in honey bee (*Apis mellifera* L.) reproductive swarming (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Behavior* **4**, 649-660.
- Winston ML, Higo HA, Slessor KN (1990) Effect of various dosages of queen mandibular gland pheromone on the inhibition of queen rearing in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Entomological society of America* **83(2)**, 234-238.
- Winston ML, Katz SJ (1982) Foraging differences between cross-fostered honeybee workers (*Apis mellifera*) of European and Africanized races. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **10**, 125-129.
- Winston ML, Punnett EN (1982) Factors determining temporal division of labor in honeybees. *Canadian Journal of Zoology*. **60**, 2947-2952.
- Winston ML, Slessor KN (1992) The Essence of Royalty - Honey Bee Queen Pheromone. *American Scientist* **80**, 374-385.
- Winston ML, Slessor KN, Willis LG, *et al.* (1989) The influence of queen mandibular pheromones on worker attraction to swarm clusters and inhibition of queen rearing in the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux* **36**, 15-27.
- Wossler TC, Crewe RM (1999a) Honeybee queen tergal gland secretion affects ovarian development in caged workers. *Apidologie* **30**, 311-320.
- Wossler TC, Crewe RM (1999b) The releaser effects of the tergal gland secretion of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Behavior* **12**, 343-350.
- Wyatt TD (2003) *Pheromones and animal behaviour*, New York.
- Wyatt TD (2009) Fifty years of pheromones. *Nature* **457**, 262-263.

Résumé :

COMMUNICATION CHIMIQUE ET REGULATIONS SOCIALES DANS LA COLONIE D'ABEILLES (*Apis mellifera* L.).

La colonie d'abeille (*Apis mellifera* L.) est une société complexe où les individus interagissent entre eux, notamment par le biais de phéromones. L'étude de cette communication chimique est indispensable à la compréhension des régulations sociales mises en place dans la colonie. Chez l'abeille, plus de 50 substances chimiques avec des effets incitateurs ou modificateurs sur la colonie ont été identifiées. Malgré ces découvertes, de nombreux travaux sont à accomplir pour mieux comprendre ce système de communication particulier.

La problématique de cette thèse vise à caractériser l'histoire de vie d'une phéromone majeure l'Oléate d'Ethyle (EO), qui permet d'optimiser l'équilibre nourrices / butineuses dans la colonie. Parallèlement, d'autres recherches ont été entreprises, notamment l'étude de la communication chimique de la reine et du couvain, chez qui seulement deux phéromones ont été identifiées avec des effets pleiotropiques dans la colonie.

Nos résultats ont mis en évidence une production variable d'EO par les ouvrières, en fonction de l'environnement de la colonie. La production de cette molécule chimique dans la colonie peut également être modifiée par un stress : des abeilles parasitées par du *Nosema* spp. ont une production anormalement élevée d'EO. En outre, cette molécule phéromonale est transmise des butineuses vers les nourrices par contact cuticulaire et par le pollen.

Pour la compréhension de la communication entre la reine et les ouvrières, nos résultats montrent que la reine utilise d'autres composés phéromonaux puissant en redondance de la QMP pour orienter la construction de cire, le phénomène de cour et l'inhibition des ovaires des ouvrières.

Chez le couvain, nous avons identifié un composé phéromonal volatil, le E- β -ocimène, produit majoritairement par les jeunes larves, inhibant le développement des ovaires des ouvrières et accélérant leur maturation comportementale.

Ces études nous ont permis d'avoir une connaissance plus précise de la communication chimique au sein de la colonie. Ainsi nous expliquons par deux théories le rôle de la complexité et de la redondance phéromonale de la colonie d'abeilles.

Mots clés : *Apis mellifera*, phéromone, larve, butineuse, nourrice, reine, E- β -ocimène, éthyle oléate, glande mandibulaire, division du travail, régulations sociales, communication chimique, effet seuil, redondance, reproduction.

Summary:

CHEMICAL COMMUNICATION AND SOCIAL REGULATION IN THE HONEY BEES COLONY (*Apis mellifera* L.)

In the honeybee colony (*Apis mellifera* L.) studies of the chemical communication are essential to understand social regulations. In the honey bee colony more than 50 chemical substances with releaser and primer effects have been identified. Despite years of research on this type of communication, significant work remains to be done.

In this thesis, the aim is to characterize the dynamics of a major pheromone: ethyl oleate (EO), which optimizes the balance between nurses and foragers in the colony. In addition, we initiated research on the queen and brood chemical communication in which only two pheromones have been identified in the colony.

We have demonstrated that EO production by workers varies under different colony environment. EO production can also be modified by stress; honey bees parasitized by the *Nosema* spp. have abnormally high EO production. In addition, we identified that EO is transmitted from foragers to nurses by contact (cuticle and pollen).

For the queen, our results indicate that the queen uses multiple redundant pheromones (QMP and other unknown compounds), that affect wax construction, retinue behaviour and worker ovary inhibition.

For the brood we have identified a volatile pheromone E- β -ocimene produced mostly by the young larvae to inhibit the development of workers ovaries and accelerate workers' behavioural maturation.

With these studies we clarify some aspects of what is known about chemical communication in the honey bee colony. Then we try to explain the role of complexity and redundancy of pheromones in the honey bee colony by two theories.

Keywords: *Apis mellifera*, pheromone, larva, foragers, nurses, queens, E- β -ocimene, oléate d'éthyle, mandibular gland, social regulation, chemical communication, redundancy, reproduction, complexity.