

DETERMINISME GENETIQUE DU COMPORTEMENT DE DEFENSE CHEZ L'ABEILLE
DOMESTIQUE (*APIS MELLIFERA*, L.).

J.-C. Lenoir¹, M.-H. Pham-Delègue¹, M. Solignac², D. Vautrin², B. Roger¹

¹ Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés.

INRA, La Guillonnerie, BP 23, 91440 Bures sur Yvette.

² Population, Génétique et Evolution.

CNRS, Bât. 13, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex.

INTRODUCTION

L'un des facteurs qui affecte la division du travail chez les abeilles est l'âge : les plus jeunes s'occupant des travaux d'intérieur, les plus âgées devenant butineuses astreintes au ravitaillement de la colonie en nourriture. Cependant, la distribution des différentes tâches à l'intérieur des groupes d'âge se fait aussi en fonction de la prédisposition génétique que peuvent avoir les abeilles. Calderone *et al.* (1989) ont démontré qu'il y avait une différence de génotype entre les butineuses qui récoltent préférentiellement le pollen et celles qui préfèrent le nectar. Il en est de même concernant d'autres comportements comme la garde de l'entrée de la ruche ou le comportement dit hygiénique (nettoyage des cellules de couvain) (Robinson et Page, 1988). La défense de la ruche fait aussi l'objet d'une division du travail et différents types de comportements ont été décrits. Certaines abeilles ont un rôle de gardiennes, elles patrouillent sur la planche d'envol, empêchent les abeilles étrangères à la ruche d'y pénétrer et recrutent leurs congénères si elles détectent une perturbation autour de la ruche. D'autres abeilles ont un rôle de défenseurs actifs de la ruche et vont au contact des agresseurs pour les mettre en fuite. Elles sont nommées soldats par Breed *et al.*, (1990). Pour ces différents comportements, une variabilité génétique a également été démontrée (Breed *et al.*, 1990).

Les recherches conduites sur l'agressivité des abeilles reposent le plus souvent sur un paradigme expérimental qui consiste à agiter une boule ou un panneau en cuir noir devant une ruche. Cette technique permet de quantifier l'intensité des attaques par comptage des aiguillons sur la cible (Guzmán-Novoa et Page, 1993 ; Millor *et al.*, 1999). Une autre technique consiste à tester individuellement des abeilles en contention. Elles reçoivent un stimulus nociceptif (faible choc électrique), qui entraîne la sortie de l'aiguillon. L'enregistrement de la réponse à ce stimulus permet de caractériser au niveau individuel les seuils de déclenchement d'une réponse agressive (Balderama *et al.*, 2002, Nuñez *et al.*, 1983, 1998)

Le système de reproduction des abeilles est haplodiploïde. La reine pond des œufs qui peuvent être fécondés ou non. Les œufs fécondés, diploïdes, donneront des femelles, les œufs haploïdes donneront des mâles. Lors du vol nuptial, la reine peut copuler et se faire inséminer par un grand nombre de mâles. Les milliers d'ouvrières qui peuplent une ruche sont donc toutes sœurs (ayant le même père) ou demi-sœurs c'est à dire de pères différents. Cette particularité permet de mettre en évidence des groupes d'individus ayant le même père, aussi appelés fratries. Le déterminisme génétique de certains comportements a notamment été démontré par l'étude des variations entre les fratries (Frumhoff et Baker, 1988 ; Robinson et Page, 1988, 1989).

L'objectif de ce travail est donc de mieux caractériser le comportement de défense testé individuellement sur des abeilles en contention et de déterminer si ce comportement est variable parmi les membres d'une même ruche, notamment en fonction de leur origine paternelle.

MATERIELS ET METHODES

Test du comportement de défense.

Les expérimentations ont été menées sur des abeilles de l'espèce *Apis mellifera* L. âgées de 12 jours qui correspond approximativement à l'âge où les ouvrières sont gardiennes. Le contrôle de l'âge des abeilles est possible en prélevant celles-ci à l'émergence sur un cadre de couvain retiré d'une ruche et placé en étuve.

A l'âge 12 jours, les abeilles sont testées selon un protocole adapté de Núñez *et al.* (1998). Chaque abeille est placée en position dorsale sur une table de contention, une électrode se positionnant entre la tête et le thorax, la seconde se situant au niveau du pétiole. Une lamelle percée d'un trou maintient l'extrémité de l'abdomen et permet de visualiser la sortie de l'aiguillon de l'insecte. Quatre chocs nociceptifs de nature électrique de 4 volts et de deux secondes sont effectués à une minute d'intervalle.

La réponse de l'abeille aux stimulations électriques est alors notée selon le niveau de sortie de l'aiguillon. L'absence de réponse est notée 0, elle est de 0,33 si l'aiguillon sort sur moins de la moitié de sa longueur et de 0,66 si il sort entre la moitié et la totalité de sa longueur. Enfin, la réponse est notée 1 si l'aiguillon sort totalement et que l'insecte découvre ses glandes associées à l'aiguillon.

Mise en évidence des fratries.

Les différentes fratries sont mises en évidence en déterminant les allèles de chaque individus pour les marqueurs moléculaires microsatellites B124, Ap19 et Ap33.

La ruche sélectionnée pour cette étude est composée de 16 fratries.

RESULTATS

Test du comportement de défense.

La réponse moyenne des abeilles décroît au fur et à mesure que les stimulations se succèdent. Cette diminution de la réponse est significative entre la première et les stimulations suivantes.

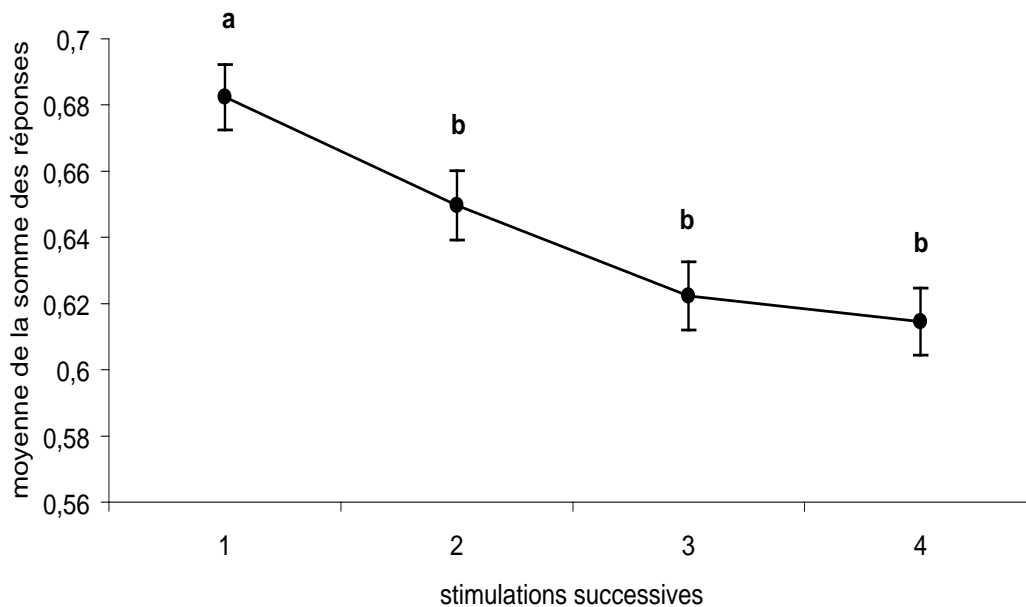


Figure 1 : Moyenne de la somme des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles (N=660) au cours des quatre stimulations successives de quatre volts. Un test de Wilcoxon comparant l'ensemble des réponses entre deux stimulations successives indique que les abeilles répondent significativement moins au cours des stimulations.

Déterminisme génétique du comportement de défense

La somme des réponses aux quatre stimulations est prise comme valeur indicative de la réponse de chaque individu. Un test de Kruskal-Wallis appliqué en fonction des différentes fratries révèle qu'il existe une différence significative dans les réponses comportementales. Certaines fratries répondent de façon « faible » comme les fratries 8 et 12 alors que d'autres répondent de façon « forte » (fratries 2, 7, 1, 9, 5, 10 et 15).

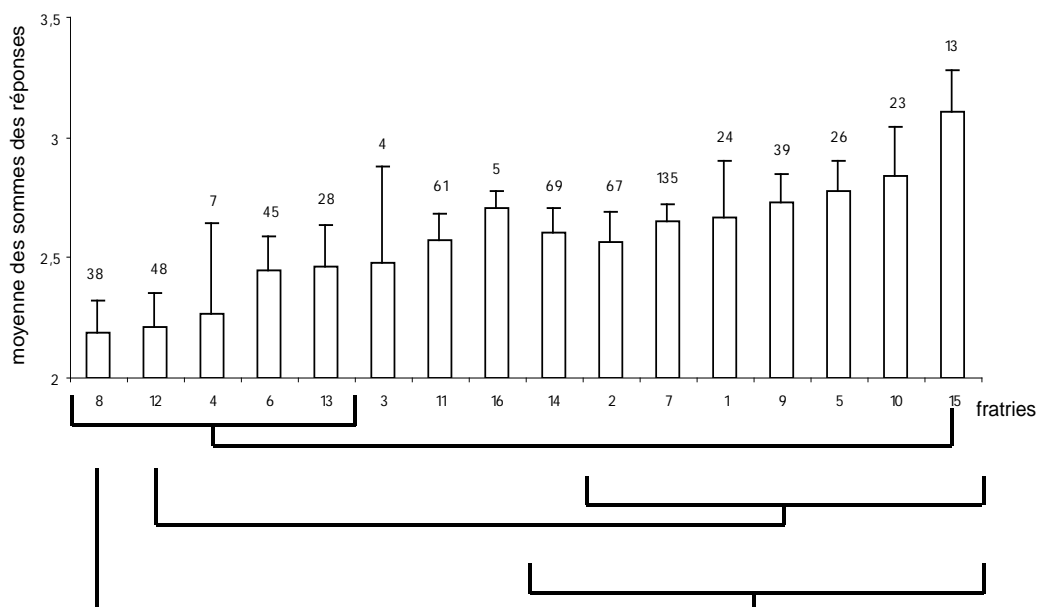


Figure 2 : **Moyenne par fratrie (\pm écart à la moyenne) des sommes des réponses aux quatre stimulations de quatre volts.** Pour tester l'effet « fratrie », un test de Kruskal-Wallis a été effectué sur la somme des réponses de chaque individu. Ce test indique une hétérogénéité des réponses entre les fratries ($P=0.0397$). Afin de définir quelles sont les fratries qui diffèrent, un test de comparaisons multiples des fratries sur la somme des réponses de chaque individu est effectué selon la méthode de Conover (1980). Les différences significatives entre fratries sont figurées sous le graphique. Par exemple, l'ensemble des réponses des individus de la fratrie 15 diffère de celui des fratries 8, 12, 4, 6 et 13 (1^{ère} accolade).

DISCUSSION

Ce travail a permis de définir sur un échantillon représentatif de l'ensemble de la population de la ruche, un seuil de réponses individuel à un stimulus agressif. Cette réponse caractérisée par la sortie de l'aiguillon, est interprétée comme un comportement défensif d'essai de piqûre. Le comportement de défense est souvent évalué en présentant une cible de cuir noir aux individus d'une ruche à qui l'on fait subir une perturbation. Cette technique permet de définir un taux d'agressivité de la colonie et de caractériser les défenseurs en analysant les aiguillons restés plantés dans le cuir. Cependant, le comportement de tous les autres membres de la colonie ne peut être connu par cette méthode. En soumettant chaque abeille à une stimulation nociceptive, c'est le profil complet de la colonie qu'il est possible d'étudier. Ce type de protocole expérimental a précédemment permis de caractériser l'effet de produits tels que la morphine, la naloxone, des peptides de la famille des opiacés (Nuñez *et al*, 1983), ou encore des substances d'alarme telles que l'isopentyl acétate ou le 2-heptanone (Balderama *et al*, 2002) sur le « réflexe d'extension de l'aiguillon ». Ces travaux traitaient les réponses au test de façon binaire : 1 quand la sortie de l'aiguillon est maximum avec visualisation des glandes associées à l'aiguillon, 0 si la réponse est plus faible. Le présent travail s'est proposé de faire une mesure de la réponse plus fine car les abeilles montrent de grandes variations dans leurs réponses à une même stimulation. En effet, dans 70% à 80% des cas les abeilles ne donnent pas une réponse maximale comme décrit

précédemment. De plus, les abeilles qui ne répondent pas du tout sont en faible proportion (2,5% à 4,2% des réponses). Il existe donc un grand nombre de réponses intermédiaires qui méritent d'être prises en compte. Les individus d'une même ruche ont un seuil variable de déclenchement d'une réponse agressive. Une mesure de la réponse avec quatre catégories possible a permis de mieux caractériser ce seuil.

Dans les travaux de Nuñez *et al.* (1983, 1998) et de Balderama *et al.* (2002), les auteurs ont fait varier la tension du stimulus électrique au cours du temps, ne prenant pas en compte un éventuel effet d'habituation ou de fatigue des abeilles testées. Les stimulations successives appliquées dans la présente étude ont été identiques (quatre volts). Les résultats indiquent que la réponse moyenne de l'ensemble des individus décroît en fonction de la répétition des stimulations. Une diminution significative de la réponse est même observée entre la première et les stimulations suivantes. Le stress induit par le stimulus agressif seul pourrait donc être suffisant pour activer un système opioïde endogène induisant une augmentation du seuil de réponse à des stimuli répétés.

De nombreuses études indiquent que certains comportements des individus d'une ruche sont sujet à des variations. L'une des hypothèses pour expliquer ces variations est la prédisposition génétique de certains individus. Robinson et Page (1988) ainsi que Breed *et al.* (1990, 1992) avaient montré l'influence de la variation génétique due à la polyandrie sur l'organisation des différentes tâches effectuées par les abeilles, notamment entre les gardiennes, les soldats (*sensus* Breed *et al.*(1990)) ou les butineuses. De même, Guzmán-Novoa *et al.* (2002) ont récemment mis en évidence le caractère dominant du comportement de défense chez l'abeille.

Les variations individuelles observées pour les réponses au test de sortie de l'aiguillon auraient également une composante génétique. Ainsi, des différences significatives dans les réponses moyennes des différentes fratries ont été montrées ici. Ceci implique un effet génétique pour ce comportement de défense. Cette variation génétique de la sensibilité pourrait s'expliquer par une différence du nombre de récepteurs à une stimulation agressive.

Moore *et al.* (1987) montre que seul un très petit nombre d'individus de la ruche exécute le rôle de gardiennes, et Robinson et Page (1988) ont démontré qu'il y avait un déterminisme génétique lié à l'activité de gardiennage. Cette activité pourrait être réalisée par certaines fratries faiblement représentées. La ruche étudiée se compose de 16 fratries. L'une de ces fratries est très représentée (fratrie n°7 : 20,45%), d'autres sont minoritaires (fratrie n°3, 4 et 16), les autres fratries représentent de 2 à 10% de la population de la ruche. La fratrie qui donne la réponse la plus importantes n'est représentée que par 13 individus sur les 632 (fratrie n°15). Cette fratrie pourrait avoir un rôle majeur dans la tâche de gardiennage de la ruche. L'échantillonnage de gardiennes et de soldats de cette ruche et la détermination de leur paternité est en cours afin de mieux définir si ces comportements sont génétiquement déterminés. Cela permettra également de mettre en relation une division des tâches observées à l'échelle de la colonie et les réponses individuelles d'extension de l'aiguillon.

REFERENCES

- Balderrama, N., J. Nuñez, F. Guerrieri, and M. Giurfa. 2002. Different functions of two alarm substances in the honeybee. *Journal of Comparative Physiology* DOI 10.1007/s00359-002-0321-y.
- Breed, M. D., E. G. Robinson, and R. E. Page. 1990. Division of labor during honey bee colony defense. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 27: 395-401.
- Breed, M. D., T. A. Smith, and A. Torres. 1992. Role of guard honey bees (Hymenoptera : Apidae) in nestmate discrimination and replacement of removed guards. *Annals of the Entomological Society of America* 85 (5): 633-637.
- Calderone, N. W., E. G. Robinson, and R. E. Page. 1989. Genetic structure and division of labor in honeybee societies. *Experientia* 45: 765-767.

- Frumlhoff, C., and J. Baker. 1988. A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature* 333: 358-361.
- Guzmán-Novoa, E., and R. E. Page. 1993. Backcrossing africanized honey bee queens to european drones reduces colony defensive behavior. *Annals of the Entomological Society of America* 86 (3): 352-355.
- Guzmán-Novoa, E., G. J. Hunt, J. L. Uribe, C. Smith, and M. E. Arechavaleta-Velasco. 2002. Confirmation of QTL effects and evidence of genetic dominance of honeybee defensive behavior : Results of colony and individual behavioral assays. *Behavior Genetics* 32 (2): 95-102.
- Millor, J., M. H. Pham-Delègue, J. L. Deneubourg, and S. Camazine. 1999. Self-organised defensive behavior in honeybees. *PNAS* 96 (22): 12611-12615.
- Moore, A. J., M. D. Breed, and M. J. Moor. 1987. The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Animal Behaviour* 35 (4): 1159-1167.
- Nuñez, J., H. Maldonado, A. Miralto, and N. Balderrama. 1983. The stinging response of the honeybee : Effects of morphine, naloxone and some opioid peptides. *Pharmacology Biochemistry & Behavior* 19: 921-924.
- Nuñez, J., L. Almeida, N. Balderrama, and M. Giurfa. 1998. Alarm pheromone induces stress analgesia via an opioid system in the honeybee. *Physiology and Behavior* 63 (1): 75-80.
- Robinson, E. G., and R. E. Page. 1988. Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333: 353-358.
- Robinson, E. G., and R. E. Page. 1989. Genetic determination of nectar foraging, pollen foraging, and nest-site scouting in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 24: 317-323.