



Déterminisme génétique du comportement de défense chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et effet d'un insecticide sur ce comportement.

Sous la direction de Mme Minh-Hà Pham-Delègue

Jean-Christophe LENOIR



DESS, Gestion, Contrôle et Conservation des Populations d'Insectes

Soutenu le 25 Septembre 2002 devant le jury composé de :

Jacques Huignard (IRBI, Tours)
Minh-Hà Pham-Delègue (INRA, Bures)
Michel Solignac (Paris 11)
Gaëlle Curée (Bayer Agro)
Nathalie Mondy (IRBI, Tours)

Remerciements

A l'issue de ce stage, je tiens à remercier tout particulièrement Minh-Hà Pham-Delègue pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et encadré durant cette étude. Je voudrais également saluer Jacques Huignard pour avoir mis en place cette première année du DESS Gestion, Contrôle et Conservation des Populations d'Insectes.

Je remercie Mercedes Charreton et Bernard Roger. Ce travail n'aurait pu être réalisé sans leur disponibilité et leurs compétences pour la préparation du matériel biologique. Je les remercie également pour m'avoir fait partager leur passion pour l'apiculture.

Je tiens à remercier Michel Solignac et son équipe, qui m'ont chaleureusement accueilli au laboratoire de Populations, Génétique et Evolution (CNRS, Gif-sur-Yvette). Je remercie en particulier Dominique Vautrin et Véronique Henriot pour m'avoir initié à la biologie moléculaire, pour leur attention, leurs conseils et leur aide.

Je voudrais remercier François-Xavier Dechaume Moncharmont pour m'avoir guidé et soutenu dans les méandres des traitements statistiques des résultats, mais aussi, comme Axel Decourtye et David Laloi, pour avoir pris le temps de la réflexion lorsque des problèmes se présentaient. Je les remercie également pour leurs longues discussions, leurs conseils ainsi que pour la relecture de ce manuscrit.

Merci à Nicolas Desneux pour avoir supporté et convoyé mes états d'âmes.

Je remercie aussi l'ensemble du laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés.

Pour leur bonne humeur et leurs conseils judicieux, je remercie Antoine, Ricardo, Hichem, FX, Axel, Nicolas, David, Philippe, Renaud et tous les membres de la F.B.B.F.

Enfin, je remercie Messieurs Dimitri Antuchev, Jesus Millor et Noël Guitton pour avoir été mes prédécesseurs sur l'étude du comportement agressif des abeilles au laboratoire.

Cette année fut intéressante et très instructive, merci.

Résumé

La défense de la ruche fait l'objet d'une division du travail. Parmi les ouvrières, un petit nombre d'abeilles a un rôle de gardiennes et d'autres, plus nombreuses, ont un rôle de défenseurs de la ruche. Pour tester l'agressivité individuelle des abeilles, un stimulus nociceptif (faible choc électrique de 4 volts) est administré pour provoquer la sortie de l'aiguillon. La réponse d'extension de l'aiguillon est interprétée comme un comportement défensif individuel d'essai de piqûre. Les résultats indiquent que la réponse moyenne de l'ensemble des individus décroît avec la répétition des stimulations. Par ailleurs, le système de reproduction haplodiploïde des abeilles, combiné à la polyandrie, permet de mettre en évidence différentes fratries au sein d'une colonie par l'utilisation de marqueurs microsatellites. Cette étude montre qu'il existe des différences dans les réponses moyennes d'extension de l'aiguillon des fratries d'une même ruche. Ceci implique l'existence d'un déterminisme génétique pour ce comportement. En effet, les fratries n'ont pas toutes le même profil de réponses aux stimulations successives. Certaines ont une réponse qui diminue au cours des stimulations, d'autres ont une réponse qui reste constante. Aucun effet de l'imidaclopride, insecticide appliqué à dose sub-létale (2 ng par abeille), n'a été démontré sur le comportement individuel de défense de l'abeille. Cependant, l'ingestion d'imidaclopride semble atténuer les différences entre fratries. Les individus traités restent agressifs plus longtemps.

Abstract

The defence of the hive is subjected to a division of labor. Among workers a small number of bees are guards and others, more numerous, are defenders of the hive. To test the bees' aggressiveness, a nociceptive electrical stimulus that causes the exit of the sting is administered. This stinging response is interpreted like an individual defensive behavior of stinging. Results indicate that the mean response of bees decreases with the successive stimulations. Otherwise, haplodiploïde reproductive system of bee combined with polyandry allows to characterize different patriline in a colony, using microsatellite markers. This study shows differences in the response of sting extension of patriline within the hive. This result suggests a genetic determinism for this behavior. Indeed, all patriline do not have the same pattern of responses along to the successive stimulations. Some have decreasing responses along stimulations, others have a response that remains constant. No effect of sub-lethal dose of imidacloprid insecticide (2 ng per bee) was demonstrated on the individual behavior of defence. However, the ingestion of imidacloprid seems to attenuate differences among patriline. Therefore, ingestion of imidacloprid appeared to keep bees aggressive longer.

Sommaire

| | |
|---|------------|
| REMERCIEMENTS | I |
| RESUME | II |
| ABSTRACT..... | II |
| SOMMAIRE..... | III |
| SOMMAIRE DES TABLEAUX ET FIGURES | V |
| 1. LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE COMPAREE DES INVERTEBRES (INRA, BURES-SUR-YVETTE) | 1 |
| 2. INTRODUCTION..... | 1 |
| 3. MATERIELS ET METHODES | 3 |
| 3.1. MATERIEL BIOLOGIQUE..... | 3 |
| 3.2. TEST DU COMPORTEMENT « D'EXTENSION DE L'AIGUILLON »..... | 4 |
| 3.3. MISE EN EVIDENCE DU NOMBRE DE FRATRIES | 5 |
| 3.3.1. <i>Extraction de L'ADN</i> | 6 |
| 3.3.2. <i>Amplification des séquences microsatellites par PCR (Polymerase Chain Reaction)</i> <i>radioactive</i> | 6 |
| 3.3.3. <i>Mise en évidence des allèles paternels</i> | 6 |
| 3.4. NOMBRE D'INDIVIDUS UTILISES POUR L'ETUDE..... | 7 |
| 3.5. TYPE D'EXPOSITION ET DOSE D'INSECTICIDE APPLIQUEE..... | 7 |
| 3.5.1. <i>Type d'exposition à l'insecticide</i> | 7 |
| 3.5.2. <i>Dose d'insecticide appliquée</i> | 7 |
| 3.6. STATISTIQUES | 8 |
| 4. RESULTATS..... | 8 |
| 4.1. ETUDE PRELIMINAIRE..... | 8 |
| 4.2. LE TEST D'EXTENSION DE L'AIGUILLON | 9 |
| 4.3. DETERMINISME GENETIQUE DU COMPORTEMENT DE DEFENSE | 10 |
| 4.3.1. <i>Choix de la ruche utilisée</i> | 10 |
| 4.3.2. <i>test d'extension de l'aiguillon pour les différentes fratries</i> | 11 |
| 4.3.3. <i>Le « profil » de réponse des fratries</i> | 12 |
| 4.4. EFFET DE L'IMIDACLOPRIDE SUR LE COMPORTEMENT DE DEFENSE | 13 |
| 4.4.1. <i>Effet global</i> | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.2. Effet en fonction des fratries..... | 14 |
| 5. DISCUSSION | 15 |
| 6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 17 |
| 7. REFERENCES..... | 19 |
| 8. ANNEXES | 21 |
| 8.1. ANNEXE 1 : BIOLOGIE MOLECULAIRE..... | 21 |
| 8.1.1. Les marqueurs microsatellites..... | 21 |
| 8.1.2. Mélange réactionnel de PCR*..... | 21 |
| 8.1.3. Gel de migration..... | 22 |
| 8.1.4. Temps de migration | 22 |
| 8.2. ANNEXE 2 : RAPPORT D'ANALYSE DE L'INSECTICIDE UTILISE | 23 |

Sommaire des tableaux et figures

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Table des différences entre les fratries. Les différences entre les fratries ont été mises en évidence en effectuant des comparaisons multiples sur la somme des réponses de chaque individu des fratries prises deux à deux selon la méthode de Conover (1980). L'indication « n.s. » signifie « non-significatif », « * » indique une différence significative à $\alpha < 0.05$, « ** » indique une différence significative à $\alpha < 0.01$. Les couples non-représentés sont non-significativement différents. | 12 |
| Tableau 2 : Séquences des loci microsattellites utilisés, séquences des amorces correspondantes, et conditions de réalisation de la PCR (température optimale d'hybridation et concentration en $MgCl_2$). | 21 |
| Tableau 3 . Nature et quantité (en μl) des produits nécessaires pour la préparation du mélange réactionnel de PCR* pour les différents loci microsattellites utilisés. | 21 |
| Tableau 4 : Nature et quantité des produits nécessaires pour la préparation de la solution d'acrylamide à 6% d'urée permettant de faire le gel de migration. | 22 |
| | |
| Figure 1 : Table de contention permettant de visualiser la sortie de l'aiguillon de l'abeille lorsqu'un choc nociceptif de nature électrique est appliquée entre les électrodes E1 et E2. (Núñez <i>et al.</i> , 1998). | 4 |
| Figure 2 : Schéma des différentes catégories de réponses au stimulus nociceptif lors du test de sortie de l'aiguillon des abeilles en contention. | 5 |
| Figure 3 : Moyenne des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles au cours des quatre stimulations successives. Les différents échantillons ont été soumis à des stimuli de tension électrique différente. Le lot qui donne les réponses les moins variables au cours du temps est le lot ayant été testé soumis à 4 volts. | 9 |
| Figure 4 : Moyenne des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles (N=660) au cours des quatre stimulations successives de 4 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. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. | 10 |
| Figure 5 : Moyenne par fratrie (\pm écart à la moyenne) des sommes des réponses aux quatre stimulations de 4 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 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)..... | 12 |
| Figure 6 : Moyenne de la somme des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles du lot témoin et du lot ayant ingéré 2ng d'imidaclopride 24 heures avant d'être testées pour les quatre stimulations successives de 4 volts. Pour chaque stimulation, le test de Wilcoxon comparant les deux lots n'a détecté aucune différence significative. Ce même test permet de mettre en évidence des différences entre les réponses données par les abeilles d'un même lot à des stimulations successives. Ainsi, pour le lot témoin, les abeilles répondent de façon significativement différente entre la première et la seconde stimulation. Il en est de même pour les individus du lot traité à l'imidaclopride entre la seconde et la troisième stimulation. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes. | 14 |

1. Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés (INRA, Bures-sur-Yvette)

Les activités de recherche du laboratoire INRA de Bures-sur-Yvette s'organisent autour de quatre axes principaux. Premièrement, les chercheurs de ce laboratoire étudient les mécanismes de reconnaissance des odeurs par les abeilles selon des approches chimiques, éthologiques et sensorielles. Ces études sont menées en conditions naturelles ou en conditions contrôlées (cage de vol, test du conditionnement de l'extension du proboscis). Des techniques d'électrophysiologie sont également utilisées, dans le cadre de collaborations, pour mettre en relation les composés détectés au niveau antennaire et ceux qui sont actifs sur le comportement. Ces études donnent des renseignements sur les aptitudes d'apprentissage de l'abeille et sur ses capacités de discrimination olfactive.

La seconde thématique est l'étude de l'effet des insecticides sur des insectes auxiliaires de l'agriculture. Ces études s'effectuent essentiellement sur l'abeille et les parasitoïdes de pucerons. Elles visent à déterminer les effets de doses non-létales ou de résidus d'insecticides sur les comportements de recherche de l'hôte et de ponte des parasitoïdes. L'impact de ces mêmes insecticides sur le succès reproducteur des parasitoïdes fait également l'objet d'investigations.

Parallèlement, le LNCI cherche à proposer des méthodologies adaptées pour l'évaluation des effets de plantes génétiquement modifiées sur les insectes pollinisateurs et sur les insectes parasites de pucerons. Ainsi, les effets indirects des plantes transformées (expression de gènes inhibiteurs de protéases, de lectines, d'endotoxine de *Bacillus thuringiensis*) sur différentes composantes de la physiologie et du comportement ont été analysés.

Enfin, ce laboratoire s'intéresse aussi à la palynologie. Les analyses polliniques renseignent sur les plantes utilisées par les abeilles mellifères et sauvages ; et sur l'origine botanique et géographique des miels.

2. Introduction

L'un des facteurs qui affecte la division du travail chez l'abeille domestique est l'âge : les jeunes ouvrières s'occupant des travaux à l'intérieur de la ruche, les plus âgées devenant butineuses et assurant le 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. Ainsi, des variations d'origine génétique dans l'âge auquel des abeilles débutent leur activité de butinage et dans la fréquence à laquelle elles effectuent les différentes tâches à l'intérieur du nid ont été démontrées par Calderone et Page (1988). En utilisant des ruches dont la reine est homozygote pour l'allèle S (Slow) de la malate deshydrogénase, et a été inséminé par des mâles ayant différents profils électrophorétiques pour cette enzyme (allèle S, M (medium), ou F (fast)), Robinson et Page (1988) ont montré une différence dans la distribution des génotypes entre les abeilles gardant l'entrée de la ruche, celles ayant un comportement hygiénique (nettoyage des cellules de couvain) et l'ensemble des ouvrières. De même, Calderone *et al.* (1989) ont démontré qu'il existe une différence génétique, en terme de proportions des diverses fratries, entre les butineuses qui récoltent préférentiellement le pollen et celles qui préfèrent le nectar. Frumhoff et Baker (1988) ont mis en évidence le déterminisme génétique du comportement de soin et de nourrissage des congénères en utilisant des colonies avec deux lignées paternelles ayant une coloration différente.

La défense de la ruche fait aussi l'objet d'une division du travail et différents types de comportements ont été décrits. Ainsi, un petit nombre d'ouvrières a un rôle de gardiennes. Elles patrouillent à l'entrée de la ruche, empêchent les abeilles étrangères à la colonie d'y pénétrer et recrutent leurs congénères si elles détectent une agression envers la ruche. D'autres abeilles, plus nombreuses, 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 piqués 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 (Nuñez *et al.*, 1983, 1998 ; Balderama *et al.*, 2002). La réponse à ce test (sortie de l'aiguillon), est interprétée comme un comportement défensif individuel d'essai de piqûre. Ce comportement est-il également sujet à des variations ayant une origine génétique?

Dans de précédents travaux, le test comportemental d'extension de l'aiguillon a 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 faisant partie de la phéromone d'alarme telles que l'isopentyl acétate ou le 2-heptanone (Balderama *et al.*, 2002). Il est possible que ce comportement soit affecté par des produits toxiques tels que des insecticides. En effet, les insecticides peuvent être à l'origine de changements comportementaux. Ainsi, au niveau de la colonie, des doses sub-létales de parathion affectent le recrutement des butineuses en perturbant les paramètres de la danse oscillante (Schricker et Stephen, 1970). De même, la perméthrine et la deltaméthrine perturbent les capacités d'orientation des butineuses (Vandame *et al.*, 1995). Decourtye *et al.* (2000), grâce à une procédure individuelle de conditionnement olfactif du réflexe d'extension du proboscis, indiquent que les abeilles traitées avec une dose sub-létale d'imidaclopride ou d'endosulfan ont une diminution de leurs performances d'apprentissage. D'autres études indiquent que certains produits provoquent une augmentation de l'agressivité des abeilles (Johansen, 1977 ; Florelli *et al.*, 1987 ; Taséi, 1998). Le test d'extension de l'aiguillon pourrait également permettre d'évaluer l'impact d'un insecticide sur le comportement de défense de l'abeille.

L'objectif de ce travail est, dans un premier temps, de mieux caractériser le comportement de défense testé individuellement sur des abeilles en contention, en affinant la mesure des réponses comportementales. Ce travail se propose ensuite de déterminer si ce comportement est variable parmi les membres d'une même ruche, notamment en fonction de leur origine paternelle.

Enfin, cette étude cherchera à définir l'impact de l'imidaclopride sur l'agressivité des abeilles.

3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériel biologique

Les expérimentations ont été menées sur des abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.) âgées de 12 jours. 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. Les abeilles ainsi prélevées à moins d'un jour sont placées dans des cagettes par lot de soixante dix et sont maintenues en étuve à l'obscurité (33°C, 50% d'humidité relative) pendant 12 jours. Elles sont

approvisionnées *ad libitum* en sucre et en eau pendant la totalité de leur élevage. Un apport de pollen est fait durant les huit premiers jours. L'ensemble des prélèvements et des expérimentations conduites sur les abeilles ont été effectués du 29 mai au 3 juillet 2002.

3.2. Test du comportement « d'extension de l'aiguillon »

A l'âge de 12 jours, les abeilles sont testées selon un protocole adapté de Nùñez *et al.* (1998). L'ensemble du dispositif se compose de cinq tables de contention. Chaque abeille, manipulée avec des pinces souples, est placée en position dorsale sur une table. Une électrode métallique se positionne entre la tête et le thorax, la seconde se situe au niveau du pétiole. L'abeille est maintenue dans cette position grâce à une lame effectuant une pression sur son mesosternum. Une lamelle percée d'un trou maintient l'extrémité de l'abdomen et permet de visualiser la sortie de l'aiguillon de l'insecte (Figure 1). Un générateur permet d'appliquer quatre chocs nociceptifs de nature électrique à une minute d'intervalle. Les abeilles sont placées dans cette position une minute avant le début des stimulations.

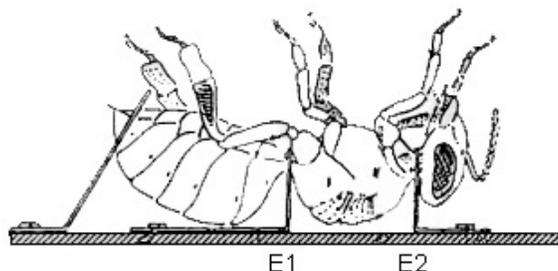


Figure 1 : **Table de contention permettant de visualiser la sortie de l'aiguillon de l'abeille** lorsqu'un choc nociceptif de nature électrique est appliquée entre les électrodes E1 et E2. (Nùñez *et al.*, 1998).

Les précédents travaux (Nùñez *et al.*, 1983, 1998 ; Guitton et Pham-Delègue, 2001 ; Balderrama *et al.*, 2002) effectuaient des stimulations dont la tension était croissante. Ces stimulations étaient de 2 volts, puis 4 volts, 8 volts et enfin 16 volts. Cette variation de tension électrique avait pour effet de faire varier la réponse des abeilles. Des tests préliminaires ont permis de mettre en évidence que la tension électrique à laquelle les abeilles répondent de façon moyenne et la plus constante est de 4 volts. Pour cette étude, les quatre stimulus successifs sont donc de 4 volts et dure 2 secondes.

La réponse de l'abeille aux stimulations électriques est notée selon le niveau de sortie de l'aiguillon. L'absence de réponse est notée 0, elle est notée 0,33 si l'aiguillon sort sur moins de la moitié de sa longueur et notée 0,66 s'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 les glandes associées à l'aiguillon (Figure 2).

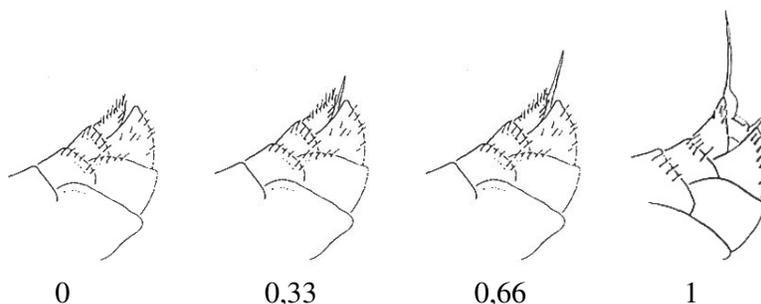


Figure 2 : Schéma des différentes catégories de réponses au stimulus nociceptif lors du test de sortie de l'aiguillon des abeilles en contention.

3.3. Mise en évidence du nombre de fratries

La recherche d'un effet génétique sur un comportement est favorisée par la structure génétique particulière des colonies d'abeilles. Les abeilles ont un système de reproduction 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 être inséminée par un grand nombre de mâles. Page (1986) indiquait que le nombre d'accouplements allait de 15 à 20 pour une seule reine. Winston (1987) indiquait que la future reine pouvait copuler avec 7 à 17 mâles. Enfin, plus récemment, en l'évaluant le nombre de pères grâce à des marqueurs moléculaires microsatellites, Estoup *et al.* (1994) indiquent qu'il trouve de 7 à 20 pères dans cinq ruches d'*Apis mellifera*. 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 patrimoine génétique issu du père étant différent pour les différentes fratries d'abeilles, un éventuel déterminisme génétique d'un comportement peut conduire à des différences intra-fratries. Les différentes fratries sont mises en évidence en utilisant des marqueurs moléculaires microsatellites¹. Afin

¹ Les marqueurs microsatellites sont des séquences d'ADN constituées par la répétition en tandem d'un motif de 1 à 5 paires de bases (pb) pour une taille totale n'excédant généralement pas 200 pb (Estoup, 1995). Leur polymorphisme est caractérisé grâce à la taille de ces marqueurs qui varie en fonction du nombre de répétitions du motif de base.

d'utiliser une ruche dont le nombre des fratries serait représentatif du cas général et dont la distribution des fratries serait relativement homogène, six colonies ont été criblées. La ruche sélectionnée a procuré le matériel biologique pour les essais comportementaux.

3.3.1. Extraction de L'ADN

Pour chaque abeille, une patte métathoracique est prélevée et découpée en plusieurs fragments. Ceux-ci sont ensuite placés dans un puits d'une plaque pour PCR de 96 puits. Dans chaque puits sont ensuite ajouté 100µl de Chelex à 10% (Biorad, resine Chelex 100) et 5 µl de protéinase K. Le tout est ensuite placé au thermocycleur qui effectue le cycle suivant : 55°C (60 min), 99°C (15 min), 37°C (1 min), 99°C (15 min) et 15°C (∞).

Après décantation, l'ADN est prélevé dans la phase liquide entre le culot de Chelex et la surface.

3.3.2. Amplification des séquences microsatellites par PCR (Polymerase Chain Reaction) radioactive

Les marqueurs microsatellites utilisés pour caractériser les fratries sont les loci B124 (Estoup *et al.*, 1994), AP33 et AP19 (Annexe 1). Ils présentent en effet une hétérozygotie suffisante pour discriminer l'ensemble des fratries des ruches testées.

L'ADN de chaque abeille est amplifié par PCR afin de multiplier le nombre de copies des loci microsatellites étudiés. A chaque échantillon sont ajouté 8 µl d'un mélange réactionnel pour PCR (la composition du mélange et l'enchaînement des cycles réalisés dans le thermocycler sont indiqués en Annexe 1).

3.3.3. Mise en évidence des allèles paternels

Avant migration sur gel, 5 µl de « Bleu de charge » sont ajoutés dans chaque échantillon pour visualiser le front de migration et dénaturer l'ADN. Les échantillons amplifiés sont ensuite dénaturés durant 5 minutes à 95°C, plongés dans la glace et 2 µl de chaque échantillon sont déposés sur un gel de polyacrylamide à 6% (Annexe 1). Une fois la migration effectuée (Annexe 1) le gel est séché puis mis en contact avec un film autoradiographique pendant environ 48 heures. Ceci permet de visualiser les séquences amplifiées et marquées par radioactivité correspondant aux allèles des loci. La lecture du film permet ensuite de caractériser différentes fratries : chaque individu possède deux allèles par locus, l'un maternel (qui peut être le même pour tous si la reine est homozygote, ou deux allèles qui apparaissent en équi-proportion dans la population si la reine est hétérozygote) et

l'autre issu du père haploïde. La prise en compte des allèles paternels pour les trois loci analysés permet de distinguer les ouvrières issues de pères différents et ainsi de définir les fratries.

3.4. Nombre d'individus utilisés pour l'étude

Dans les limites de disponibilité en matériel biologique, les prélèvements successifs dans la ruche ont été espacés pour garantir la survie de la colonie. Ainsi 660 individus ont été testés pour chaque lot expérimental (un lot témoin et un lot traité par une dose sub-létale d'imidaclopride). Le comportement de défense a donc été caractérisé pour un total de 1320 abeilles.

3.5. Type d'exposition et dose d'insecticide appliquée

3.5.1. Type d'exposition à l'insecticide

L'imidaclopride est un insecticide de la famille des néonicotonoïdes. Cette molécule est neurotoxique et elle agit sur le système cholinergique. Sa toxicité envers les insectes est en partie due à sa grande affinité pour les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine des insectes (Matsuda *et al.*, 2001).

L'étude de l'effet de l'imidaclopride sur le comportement de défense a été faite en utilisant la Méthode n° 95 de la Commission des Essais Biologiques pour évaluer la toxicité aiguë orale de produits phytosanitaires (A.N.P.P., 1996). Cette méthode consiste à proposer, après 2 heures de jeûne à l'obscurité, 10 µl par abeille d'une solution sucrée contenant une quantité donnée d'insecticide. Une fois la totalité de la solution contaminée consommée, les abeilles sont approvisionnées *ad libitum* en sirop (500g de saccharose par litre d'eau distillée) et en eau jusqu'au moment du test comportemental. Celui-ci a lieu 24 heures après l'ingestion du produit.

3.5.2. Dose d'insecticide appliquée

Ce travail propose de rechercher un effet sub-létal d'un insecticide sur le comportement de défense de l'abeille. La dose administrée aux abeilles testées doit donc avoir

un faible impact sur la survie des individus. Cette dose devait donc être très inférieure à la DL50².

Des études sur la DL50 de l'imidaclopride ayant été menées précédemment au laboratoire, la dose d'insecticide administrée aux abeilles pour ce travail correspond à la DL50 (sur 24 heures) divisée par quarante (Decourtye, 2002). La dose administrée à chaque abeille est donc de $(DL50_{24h}/40) = (80 \text{ ng}/40) = 2 \text{ ng}$.

Une solution mère contenant de l'imidaclopride (Annexe 2) dissout dans de l'eau distillée à 0,4 mg/mL est diluée aux deux millièmes dans un sirop composé de saccharose à 500g/L d'eau distillée.

3.6. Statistiques

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel S-plus (Venables et Ripley, 1999).

Pour comparer l'effet global des stimulations sur les lots témoin ou traité par ingestion de 2 ng d'imidaclopride, c'est l'ensemble des réponses des individus pour chaque stimulation qui a été utilisé comme variable. Les comparaisons entre ces variables ont été faites en appliquant des tests de Wilcoxon.

Pour comparer l'effet des stimulations sur les différentes fratries, c'est l'ensemble de la somme des quatre réponses des individus de chaque fratries qui a été prise comme variable. Un test de Kruskal-Wallis a permis de déterminer s'il y avait un effet « fratrie » sur le comportement testé.

Dans le cas où un effet « fratrie » global est mis en évidence, alors des comparaisons multiples selon la méthode de Conover (1980) sont appliquées à toutes les fratries deux-à-deux afin de préciser celles qui diffèrent.

4. Résultats

4.1. Etude préliminaire

Une étude préliminaire sur le test d'extension de l'aiguillon a été effectuée afin de définir quelle tension électrique semblait la plus appropriée pour cette étude (Figure 3).

² La DL50 correspond à la dose d'insecticide par abeille qui induit une mortalité de 50% des individus traités. Elle est déterminée 24 ou 48 heures après le traitement.

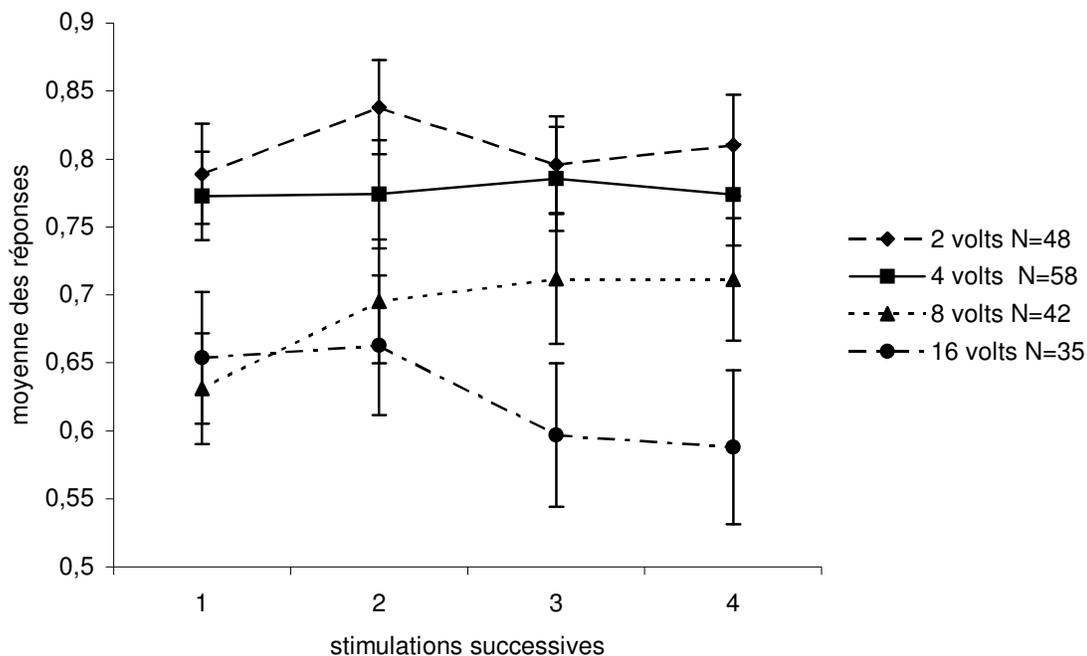


Figure 3 : **Moyenne des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles au cours des quatre stimulations successives.** Les différents échantillons ont été soumis à des stimuli de tension électrique différente. Le lot qui donne les réponses les moins variables au cours du temps est le lot ayant été testé soumis à 4 volts.

Afin de visualiser l'éventuel effet d'un insecticide sur le comportement de défense individuel, il faut que la réponse « témoin » soit la moins variable possible. Le test effectué à 4 volts donne les réponses les plus stables. Cette tension électrique sera donc appliquée pour la suite de cette étude.

4.2. Le test d'extension de l'aiguillon

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 la seconde stimulation (Figure 4).

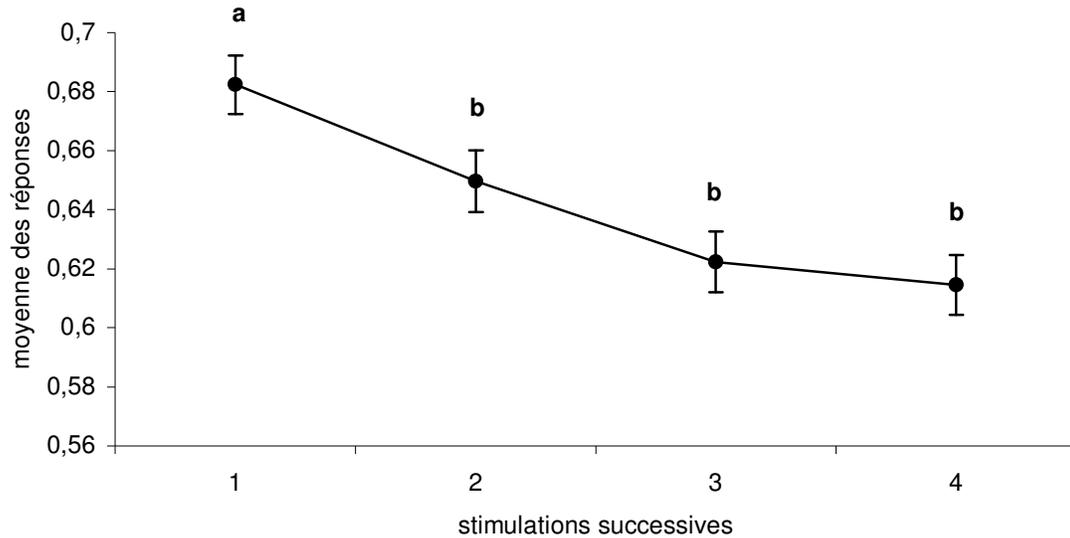


Figure 4 : **Moyenne des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles (N=660) au cours des quatre stimulations successives de 4 volts.** Un test de Wilcoxon comparant l'ensemble des réponses entre deux stimulations successives indique que les abeilles répondent significativement moins au cours des stimulations. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

Ce résultat indique qu'il existe un mécanisme qui fait varier la réponse des abeilles au cours des stimulations. Cette variation s'exprime par une diminution de la réponse, ce qui correspond vraisemblablement à une augmentation du seuil de déclenchement de cette réponse.

4.3. Déterminisme génétique du comportement de défense

4.3.1. Choix de la ruche utilisée

Six colonies (Ruches 13, 28P, 50, 53, 58 et 64) ont été testées afin de définir le nombre et la distribution de leurs fratries et de choisir la plus appropriée pour cette étude.

Cinq ruches ont été écartées pour les raisons suivantes :

Ruche 28P : 15 fratries indentifiées mais plusieurs mâles semblent posséder les mêmes allèles que la reine, notamment pour le locus B124 qui est normalement très discriminant. Ceci engendre des difficultés de lecture des génotypes et donc de caractérisation des fratries.

Ruche 50 : difficulté de lecture du locus Ap19 qui est très peu variable pour les différentes fratries. Le grand nombre d'individus issus de la dérive apicole (individus originaires d'autres colonies) n'a permis d'utiliser que 32 individus réellement issus de la

reine sur les 48 individus prélevés dans la ruche. Cette ruche est apparemment composée de 18 fratries.

Ruche 53 : 9 fratries dont une trop majoritaire (68,29% de l'échantillon de 41 individus testés), et la femelle est homozygote pour les loci B124 et Ap19.

Ruche 58 : 15 fratries, et la femelle est homozygote pour les loci B124 et Ap19. Cette ruche était une candidate potentielle pour cette étude.

Ruche 64 : 15 fratries relativement bien distribuées (au maximum 20,93% de l'échantillon de 43 individus testés), mais pour le locus B124, la reine est hétérozygote et deux mâles apportent de l'ambiguïté dans la lecture des résultats car ils ont chacun un allèle identique à celui de la reine et les deux autres loci ne permettent pas de les distinguer.

La première estimation du nombre et de la proportion des fratries de la ruche 13 s'est effectuée sur 45 individus et a révélé 15 fratries bien distribuées. Afin d'affiner cette estimation, une seconde estimation a été menée sur 93 individus supplémentaires de cette colonie. La compilation des deux échantillonnages indique que la population d'abeilles s'organise en 15 fratries dont aucune ne dépasse 13,88% de la population totale. La répartition des individus dans ces fratries est donc relativement homogène ce qui est recherché pour mener à bien la suite de cette étude.

Le grand nombre d'individus utilisés durant ce travail a permis la découverte d'une 16^{ème} fratrie pour cette ruche.

4.3.2. test d'extension de l'aiguillon pour les différentes fratries

Un test de Kruskal-Wallis appliqué sur l'échantillon témoin en fonction des différentes fratries révèle qu'il existe une différence significative de la distribution de la somme des réponses comportementales (Figure 5). Certaines fratries répondent globalement de façon « faible », comme les fratries 8, 12, 4, 6 ou encore 13, alors que d'autres répondent de façon « forte » (fratries 7, 1, 9, 5, 10 et 15).

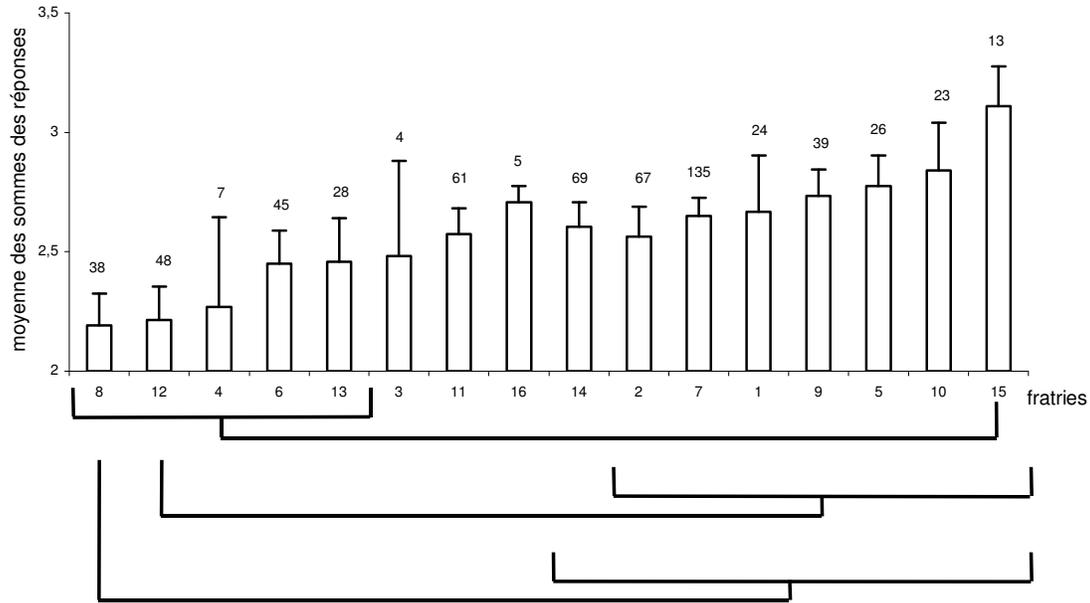


Figure 5 : **Moyenne par fratrie (± écart à la moyenne) des sommes des réponses aux quatre stimulations de 4 volts.** Pour tester l'effet « fratrie », un test de Kruskal-Wallis a été effectué sur la somme des réponses de chaque individu. Ce test indique une hétérogénéité des réponses entre les fraternies ($P=0.0397$). Afin de définir quelles sont les fraternies qui diffèrent, un test de comparaisons multiples des fraternies est effectué selon la méthode de Conover (1980). Les différences significatives entre fraternies sont figurées sous le graphique. Par exemple, l'ensemble des réponses des individus de la fratrie 15 diffère de celui des fraternies 8, 12, 4, 6 et 13 (1^{ère} accolade).

Tableau 1 : **Table des différences entre les fraternies.** Les différences entre les fraternies ont été mises en évidence en effectuant des comparaisons multiples sur la somme des réponses de chaque individu des fraternies prises deux à deux selon la méthode de Conover (1980). L'indication « n.s. » signifie « non-significatif », « * » indique une différence significative à $\alpha < 0.05$, « ** » indique une différence significative à $\alpha < 0.01$. Les couples non-représentés sont non-significativement différents.

| Fratries | 8 | 12 | 4 | 6 | 13 | 3 | 11 | 16 | 14 | 2 | 7 | 1 | 9 | 5 | 10 | 15 |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|---------------|---------------|
| 8 | X | n.s. | *(p=0.0306) | *(p=0.0226) | ***(p=0.0074) | *(p=0.0162) | *(p=0.0112) | *(p=0.0163) | ***(p=0.0047) | ***(p=0.0016) |
| 12 | n.s. | X | n.s. | *(p=0.0413) | *(p=0.0136) | *(p=0.0280) | *(p=0.0201) | *(p=0.0282) | ***(p=0.0082) | ***(p=0.0027) |
| 4 | n.s. | n.s. | X | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | *(p=0.0358) |
| 6 | n.s. | n.s. | n.s. | X | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | *(p=0.0162) |
| 13 | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | X | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | n.s. | *(p=0.0283) |

Il existe des différences dans la réponse des ouvrières appartenant aux différentes fraternies, il y a donc une part de déterminisme génétique dans la réponse à un stimulus nociceptif.

4.3.3. Le « profil » de réponse des fraternies

La différence de réponse globale entre les fraternies provient de différences dans l'évolution de la réponse au cours des stimulations successives. Un test de Kruskal-Wallis révèle qu'il existe des différences en fonction des fraternies dans la distribution de la somme des

réponses comportementales pour la troisième et la dernière stimulation. Un test de Wilcoxon évaluant les différences entre la somme des réponses à chacune des quatre stimulations pour chaque fratrie a donc été effectué. Il indique que 6 fratries ont une réponse qui diminue au cours des stimulations. C'est notamment le cas des fratries 8, 12 et 6. Leur niveau global de réponse est donc faible. Les autres fratries ont une réponse qui peut être considérée comme constante. Leur niveau global de réponse est donc plus élevé (fratries 9, 5, 10 et 15). Les différentes fratries n'ont donc pas le même profil de réponse au cours des stimulations. Ces deux types de fratries voient leurs différences de réponse devenir significative à partir de la troisième stimulation.

4.4. Effet de l'imidaclopride sur le comportement de défense

La dose de 2 ng d'imidaclopride par abeille semble bien être sub-létale. En effet, un effet du produit est observé seulement quelques heures après ingestion : l'activité locomotrice de l'ensemble des individus des cagettes est de beaucoup diminuée. Celles-ci deviennent léthargiques pour une durée pouvant dépasser 12 heures. Cependant, au bout de 24 heures, les individus ont retrouvé une activité locomotrice normale.

4.4.1. Effet global

Les tests de Wilcoxon sur la réponse globale aux stimulations successives indiquent qu'il n'y a pas de différence entre le groupe témoin et le groupe traité la dose de 2ng d'imidaclopride. Cependant, il existe une différence du profil de réponse au cours des quatre stimulations successives (Figure 6). Le groupe témoin produit des réponses moyennes de plus en plus faibles avec une différence significative entre la première et la seconde réponse. Le groupe traité donne des réponses qui, bien que non significativement différentes de celles du groupe témoin, sont un peu plus fortes sauf pour la première stimulation. La diminution de la réponse s'observe également mais seulement à partir de la troisième stimulation. Les deux premières stimulations provoquent des réponses de même intensité.

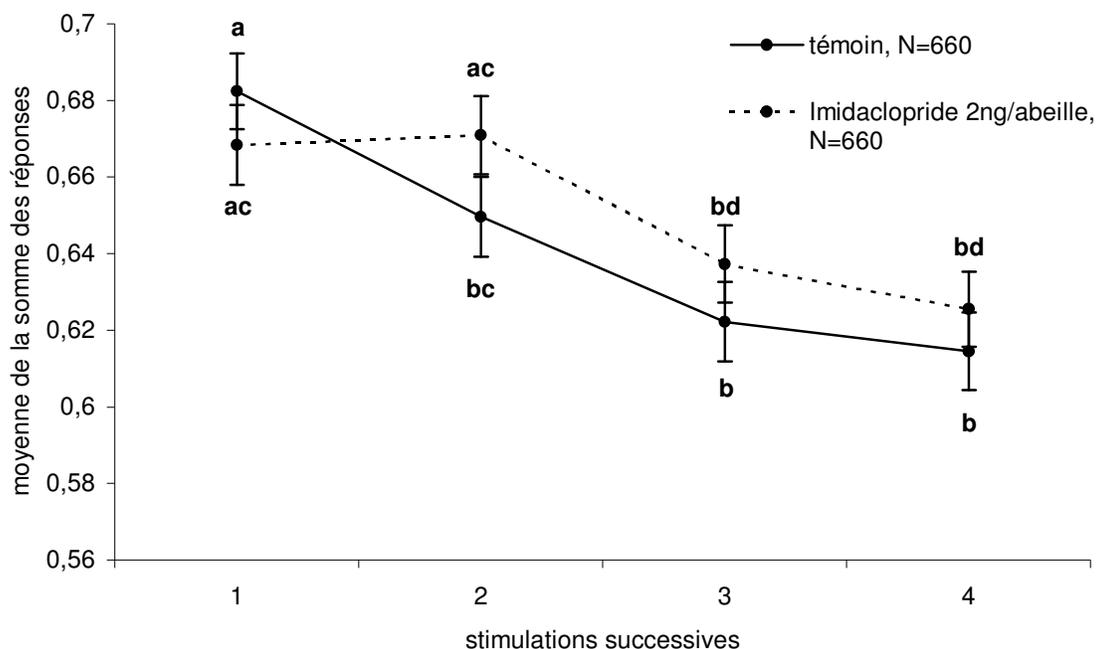


Figure 6 : Moyenne de la somme des réponses (\pm écart à la moyenne) de l'ensemble des abeilles du lot témoin et du lot ayant ingéré 2ng d'imidaclopride 24 heures avant d'être testées pour les quatre stimulations successives de 4 volts. Pour chaque stimulation, le test de Wilcoxon comparant les deux lots n'a détecté aucune différence significative. Ce même test permet de mettre en évidence des différences entre les réponses données par les abeilles d'un même lot à des stimulations successives. Ainsi, pour le lot témoin, les abeilles répondent de façon significativement différente entre la première et la seconde stimulation. Il en est de même pour les individus du lot traité à l'imidaclopride entre la seconde et la troisième stimulation. Des lettres différentes indiquent des valeurs significativement différentes.

Il n'y a pas de différence significative pour chaque stimulation entre le groupe témoin et le groupe traité par une dose sub-létale d'imidaclopride. Il est cependant possible de remarquer que la réponse du groupe traité est plus constante que celle du groupe témoin.

4.4.2. Effet en fonction des fratries

Pour le lot traité, le test de Kruskal-Wallis en fonction des fratries indique qu'il n'existe pas de différence de la distribution de la somme des réponses comportementales pour chaque stimulation.

Le test de Wilcoxon montre qu'il y a moins de fratries dont la réponse diminue au fur et à mesure des stimulations (4 fratries au lieu de 6 pour le lot témoin). En effet, deux fratries (8 et 6) qui montraient des réponses décroissantes au cours des stimulations successives (et en conséquence une réponse globale faible), voient leurs réponses devenir constantes. Les

fratries qui dans le groupe témoin avaient des réponses constantes et fortes ne changent pas de type de réponse après traitement à l'imidaclopride (fratries 9, 5, 10 et 15).

Les réponses des fratries du groupe traité sont donc globalement plus constantes. Le seuil de déclenchement de la réponse à un stimulus nociceptif varie de façon moins importante.

L'imidaclopride semble donc avoir un effet sur l'adaptation de la réponse de défense au cours de stimulations nociceptives successives.

5. Discussion

Ce travail a permis de définir sur un échantillon représentatif de l'ensemble de la population de la ruche, un seuil de réponse individuel à un stimulus agressif. Les travaux précédents qui utilisaient le test d'extension de l'aiguillon (Nuñez *et al.*, 1983, 1998 ; Balderama *et al.*, 2002) traitaient les réponses au test de façon binaire : 1 quand la sortie de l'aiguillon est maximale 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 plus fine de ce type de réponse car les ouvrières montrent une grande variation 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 aggressive. Une mesure de la réponse avec quatre catégories possibles a permis de mieux caractériser ce seuil. De faibles variations de réponses peuvent ainsi être détectées. Des différences entre groupes proches peuvent être appréciées comme par exemple entre fratries.

Dans les travaux de Nuñez *et al.* (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 (4 volts). Les résultats indiquent que la réponse moyenne de l'ensemble des individus décroît avec la répétition des stimulations, une diminution significative de la réponse étant même observée entre la première stimulation et les suivantes (Figure 4). Différentes hypothèses peuvent expliquer ce résultat. (1) La répétition des stimulations pourrait induire un phénomène d'habituation. La stimulation provoquant un essai de piqûre qui n'aboutit pas à une piqûre « vraie », l'abeille arrête de

répondre au stimulus. (2) Le stress induit par le stimulus agressif seul pourrait être suffisant pour activer un système opioïde endogène ayant un effet analgésique et induisant une augmentation du seuil de réponse à des stimuli répétés. (3) La répétition des réponses pourrait induire une fatigue des muscles associés à l'aiguillon. (4) Dans le même ordre d'idée, il pourrait y avoir une saturation physiologique du système. Par exemple, l'élimination d'un médiateur pourrait être plus lente que l'intervalle temporel entre les stimulations. Certaines de ces hypothèses pourraient être testées en faisant varier le temps séparant les stimulations de même niveau ou en augmentant légèrement le niveau des stimulations.

De nombreuses études indiquent que certains comportements des individus d'une ruche sont sujets 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) ont montré l'influence de la diversité génétique due à la polyandrie sur l'organisation des différentes tâches effectuées par les ouvrières, notamment entre les gardiennes, les soldats (*sensu* 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. En effet, des ruches issu de croisements entre sexuées de races « européennes » et « africanisées » montrent que le phénotype « africanisé » (fort comportement de défense) est génétiquement dominant.

Les résultats présentés indiquent que les variations individuelles observées pour les réponses au test d'extension de l'aiguillon auraient également une composante génétique. La structure génétique de la ruche étudiée n'est pas homogène. Cette ruche se compose de 16 fratries qui ne sont pas représentées dans les mêmes proportions. L'une de ces fratries est très représentée (fratrie n°7 : 20,45%), d'autres sont minoritaires (fratries n°3, 4 et 16), les dernières fratries ne représentant que 2 à 10% de la population de la ruche. Ce travail a mis en évidence des différences significatives dans les réponses moyennes des différentes fratries lors du test d'extension de l'aiguillon. Ceci implique un effet génétique pour ce comportement de défense. Cette variation de la sensibilité des fratries pourrait s'expliquer par une différence de génotype exprimant plus ou moins de récepteurs à un stimulus agressif.

Moore *et al.* (1987) montrent 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 de l'activité de gardiennage. Cette activité pourrait être réalisée préférentiellement par des fratries particulièrement sensibles à des signaux indiquant une perturbation ainsi qu'à des stimuli agressifs. Les fratries qui donnent les réponses les plus

importantes (fratrie n°10 ou 15) pourraient avoir un rôle majeur dans la tâche de gardiennage de la ruche.

Les fratries constituant la ruche n'ont pas toutes le même profil de réponses aux stimulations successives. Certaines ont une réponse qui diminue au cours des stimulations, d'autres ont une réponse qui reste constante (ces dernières ont une réponse moyenne plus élevée). Cette différence dans le profil des réponses indique que les fratries n'ont pas la même capacité « d'habituation » face à une stimulation nociceptive. Ainsi, face à une perturbation agressive répétée, une partie de la population d'ouvrières resterait en alerte et active alors que les autres deviendraient moins sensibles au stimulus et arrêteraient de répondre.

Ce test d'extension de l'aiguillon peut-il s'intégrer dans un protocole mesurant l'effet d'un insecticide sur le comportement de l'abeille ?

Les résultats de la figure 6 montrent qu'il n'y a pas de différence dans la réponse des témoins et du lot d'abeilles traitées par une dose sub-létale de 2 ng d'imidaclopride par abeille. A priori, il ne semble donc pas y avoir d'effet de cet insecticide sur le comportement individuel de défense de l'abeille. Cependant, les réponses du lot traité sont moins variables que celles du lot témoin (plus faibles lors de la première stimulation, plus fortes ensuite). Il y a également plus de fratries dont la réponse ne diminue pas au cours des stimulations successives. De plus, les réponses des fratries ne sont pas différentes les unes des autres selon les stimulations. L'imidaclopride a donc un effet sur le comportement d'extension de l'aiguillon. Ce produit fait disparaître les différences qui existaient entre les fratries du lot témoin. Les ouvrières sont agressives plus longtemps. Ce neurotoxique est connu pour avoir des effets sur les phénomènes de mémorisation (Decourtye *et al.*, 1999 ; Guez *et al.*, 2001 ; Lambin *et al.*, 2001), il pourrait donc avoir un effet sur une éventuelle habituation des abeilles au stimulus répété. De même, son action sur le système opioïde endogène est possible.

6. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence qu'il existait au sein d'une ruche un déterminisme génétique du comportement de défense des abeilles. L'analyse inter-fratries indique que les abeilles n'ont pas toutes la même sensibilité à un stimulus nociceptif. Ceci suggère qu'il existe une base génétique au comportement d'extension de l'aiguillon et donc au comportement de défense. Les abeilles qui ont les réponses les plus élevées pourraient montrer des prédispositions au gardiennage. L'échantillonnage de gardiennes et de soldats de cette ruche et la détermination de leurs paternités est en cours afin de préciser si ces

comportements sont génétiquement déterminés, et d'essayer de mettre en relation la division des tâches observées à l'échelle de la colonie avec les réponses individuelles d'extension de l'aiguillon.

Bien que cette procédure ne montre pas d'effet global de l'ingestion de 2 ng d'imidaclopride par abeille, il y a un effet de cet insecticide sur le comportement de certaines fratries. Ces dernières sont agressives plus longtemps. Le test de différentes doses sub-létales de l'insecticide permettrait d'affiner cette procédure. Cela permettrait également de déterminer un seuil à partir duquel le produit testé a un effet sur le comportement. Ce test d'extension de l'aiguillon pourrait certainement s'intégrer dans un protocole mesurant l'effet d'un insecticide sur le comportement de l'abeille.

7. Références

- A.N.P.P. 1996.** Méthode de laboratoire d'évaluation de la toxicité aiguë orale et de contact des produits phytopharmaceutiques chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L. Méthode n°95. Commission des essais biologiques A.N.P.P. Paris.
- 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 defence. *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., and R. E. Page. 1988.** Genotypic variability in age polymorphism and task specialization in the honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 22: 17-25.
- Calderone, N. W., E. G. Robinson, and R. E. Page. 1989.** Genetic structure and division of labor in honeybee societies. *Experientia* 45: 765-767.
- Conover, W. J. 1980.** Practical nonparametric statistics. 2nd edition, pp. 231.
- Decourtye, A., M. Le Metayer, H. Pottiau, M. Tisseur, J. F. Odoux, and M. H. Pham-Delègue. 1999.** Impairment of olfactory learning performances in the honey bee after long term ingestion of imidaclopride, *Les Colloques n°98*. Ed. INRA, Paris, 2001, Avignon (France). pp. 113-117.
- Decourtye, A., E. Genecque, D. Marsault, and M. H. Pham-Delègue. 2000.** Diminution des performances d'apprentissage olfactif après exposition chronique d'imidaclopride et à l'hydroxy-imidaclopride chez l'abeille domestique *Apis mellifera* L, pp. 149-153, Journées Internationales d'Orsay sur les Sciences Cognitives.
- Decourtye, A. 2002.** Etude de l'impact de produits phytopharmaceutiques sur la survie et l'apprentissage associatif chez l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.). Thèse de doctorat, Université Paris XI, Orsay. pp. 225.
- Estoup, A., M. Solignac, and J. M. Cornuet. 1994.** Precise assessment of the number of patriline and of genetic relatedness in honeybee colonies. *Proceeding of the Royal Society of London* 258 B: 1-7.
- Estoup, A. 1995.** Apport des marqueurs microsatellites pour l'étude de la variabilité génétique chez deux insectes sociaux, l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) et le bourdon (*Bombus terrestris* L.) : de la colonie à l'espèce. Thèse de doctorat, Université Paris Sud, Orsay. pp. 69.
- Florelli, F., P. Garnier, and L. Roa. 1987.** Bilan de 8 années d'expérimentation sur la sélectivité du Décis vis-à-vis des abeilles. *La Défense des Vététaux* 43: 65-72.
- Frumlhoff, C., and J. Baker. 1988.** A genetic component to division of labour within honey bee colonies. *Nature* 333: 358-361.
- Guez, D., S. Suchail, M. Gauthier, R. Maleszka, and L. P. Belzunces. 2001.** Contrasting effects of imidacloprid on habituation in 7- and 8-day-old honeybees (*Apis mellifera*). *Neurobiology of Learning and Memory* 76: 183-191.
- Guitton, N., and M. H. Pham-Delègue. 2001.** Les composantes du comportement de défense chez l'abeille *Apis mellifera* L. *Bull. Tech. Apic.* 38 (3): 111-122.

- Guzmán-Novoa, E., and R. E. Page. 1993.** Backcrossing Africanised 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.
- Johansen, C. A. 1977.** Pesticides and pollinators. *Annual Review of Entomology* 22: 177-192.
- Lambin, M., C. Armengaud, and M. Gauthier. 2001.** Imidacloprid-induced facilitation of the proboscis extension reflex habituation in the honeybee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48: 129-134.
- Matsuda, K., S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso, and D. B. Sattelle. 2001.** Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Sciences* 22 (11): 573-580.
- 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 (6): 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.
- Page, R. E. 1986.** Sperm utilisation in social insects. *Ann. Rev. Entomol.* 31: 297-320.
- Robinson, E. G., and R. E. Page. 1988.** Genetic determination of guarding and undertaking in honey-bee colonies. *Nature* 333: 353-358.
- Schricker, B., and W. P. Stephen. 1970.** The effect of sublethal doses of parathion on honeybee behaviour. I. Oral administration and communication dance. *J. Apic. Res.* 9: 141-153.
- Taséi, J.-N. 1998.** Insecticides et pollinisateurs. *Bull. Tech. Apic.* 25 (2): 87-90.
- Vandame, R., M. Meled, M. E. Colin, and L. P. Belzunces. 1995.** Alteration of the homing-flight in the honeybee *Apis mellifera* L. expose to sublethal dose of deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14: 855-860.
- Venables, W. N., and B. D. Ripley. 1999.** *Modern applied statistics with S-plus.* Springer-Verlag, New York, pp. 501.
- Winston, M. L. 1987.** *The biology of the honey bee.* Harvard University Press.

8. Annexes

8.1. Annexe 1 : Biologie moléculaire

8.1.1. Les marqueurs microsatellites

Tableau 2 : Séquences des loci microsatellites utilisés, séquences des amorces correspondantes, et conditions de réalisation de la PCR (température optimale d'hybridation et concentration en MgCl₂).

| Locus | Séquence centrale | Séquence des amorces | Tm (°C) | MgCl ₂ (mM) |
|-------|--|--|---------|------------------------|
| B124 | (CT) ₈ ...(CT) ₁₄ CCTC(GC) ₃ ...(GGCT) ₈ | 5'-GCAACAGGTCGGGTTAGAG-3' 5'-CAGGATAGGGTAGGTAAGCAG-3' | 55 | 1,5 |
| Ap33 | (CT) ₁₅ | 5'-TTTCTTTTTGTGGACAGCG-3' 5'-AAATATGGCGAAACGTGTG-3' | 54 | 1,2 |
| Ap19 | (TC) ₁₁ | 5'-CTCGTTTCTTCCATTGCG-3' 5'-CGGTACGCGGTAGAAAGA-3' | 56 | 1,2 |

8.1.2. Mélange réactionnel de PCR*

Tableau 3 . Nature et quantité (en µl) des produits nécessaires pour la préparation du mélange réactionnel de PCR* pour les différents loci microsatellites utilisés.

| Produits | B124 | Ap33 + Ap19 |
|-----------------------------|------|-------------|
| H ₂ O | 460 | 410 |
| Tampon(Mg Free Buffer 10x) | 108 | 108 |
| MgCl ₂ | 64.8 | 51.84 |
| dGTC+dATP | 178 | 178 |
| BSA | 21.6 | 21.6 |
| Amorces 1+2 | 86.4 | 86.4 x2 |
| Taq polymerase | 8.64 | 10 |
| dATP* | 1 | 2 |

8µl de ce mélange devra être ajouté à 2µl d'ADN de chaque échantillon avant d'être placé dans un thermocycleur effectuant les cycles suivants :

| | | |
|---------|------|--------|
| Temps 0 | 94°C | 3 sec |
| 1 | 94°C | 30 sec |
| 2 | 55°C | 30 sec |
| 3 | 72°C | 30 sec |
| 4 | 72°C | 10 min |
| 5 | 15°C | ∞ |

Le nombre de cycles (1+2+3) est de 35.

8.1.3. Gel de migration

Tableau 4 : Nature et quantité des produits nécessaires pour la préparation de la solution d'acrylamide à 6% d'urée permettant de faire le gel de migration.

| Produit | Quantité |
|-----------------------|----------|
| Urée cristallisée | 192 mg |
| Solution d'acrylamide | 60 ml |
| TBE 10x | 40 ml |
| H ₂ O | 140 ml |

Pour la préparation du gel, 60 ml de solution d'acrylamide à 6% d'urée doivent être filtrés et mélangés sous agitation à 360 µl d'une solution de persulfate d'ammonium à 10% et 60 µl de TEMED quelques secondes avant d'être coulés entre deux plaques de verre. La polymérisation du gel dure 30 minutes. Une fois polymérisé, le gel est installé sur une cuve à migration et est mis à préchauffer durant 30 minutes avant le dépôt des échantillons et migration.

8.1.4. Temps de migration

Le dépôt des échantillons pour le duplex de loci Ap33+Ap19 est suivi d'une première migration de 1 heure (1600V, 40mA, 60W). Suit alors le dépôt des mêmes échantillons pour le locus B124. La migration est ensuite de 3 heures.

8.2. Annexe 2 : Rapport d'analyse de l'insecticide utilisé

