

EVOLUTION COMPAREE DES TAUX DE L'HORMONE JUVENILE ET DES
ECDYSTEROÏDES CIRCULANTS CHEZ LES PRÉNYMPHES REINES ET OUVRIÈRES
DE DEUX ESPÈCES DE BOURDONS (BOMBUS HYPNORUM, BOMBUS TERRESTRIS).

par

A. STRAMBI, C. STRAMBI, P.-F. RÖSELER*, I. RÖSELER*.

CNRS-INP 5, BP 71, F-13277-Marseille cedex 9 (France)

*Zool. Inst. II, Röntgenring 10, D 37 Würzburg (RFA).

Résumé: A l'aide de dosages radioimmunologiques, nous avons étudié les taux des ecdystéroïdes et de la JH circulants au cours de la prénymphe de deux espèces de Bourdons. Les variations temporelles et quantitatives des concentrations sont discutées en rapport avec la biologie des espèces et la détermination des castes.

Mots-clés: *dosages radioimmunologiques, ecdystéroïdes, hormone juvénile, Bombus.*

Summary: Fluctuations of juvenile hormone and ecdysteroids titres in workers and queens prepupae of two species of Bombus (B. hypnorum, B. terrestris)

The titres of juvenile hormone III and of Ecdysteroids were measured throughout prepupal development of Bombus terrestris and Bombus hypnorum. The precision of the radioimmunoassays allowed us to determine the levels of both hormones from a single animal haemolymph sample. The concentrations of both hormones show a clear peak, the timing of which vary according to the caste. Concentrations and time sequences are discussed in relation to species biology and caste specificity.

Key-words: *radioimmunoassays, ecdysteroids, juvenile hormone, prepupae, Bombus.*

INTRODUCTION

Chez les Abeilles sociales, la formation des castes est liée à des modulations hormonales. Des taux élevés d'Hormones juvéniles (JH) pendant les derniers stades larvaires semblent être impliqués dans le développement des reines (DE WILDE et BEETSMA, 1982). L'application de JH peut induire la différenciation dans le sens reine chez les abeilles (ASENCOT et LENSKY, 1976; GOEWIE et BEETSMA, 1976; COPIJN et al., 1979), les Mellipones (VELTHUIS et VELTHUIS-KLUPPEL, 1975) et les Bourdons (RÖSELER, 1976, 1977). Ce dernier auteur a mis en évidence deux mécanismes de différenciation des castes:

Chez Bombus hypnorum, le développement des larves vers l'une ou l'autre caste est induit par la quantité de nourriture reçue durant le dernier stade larvaire. On peut penser que la prise de nourriture entraîne la production de JH. L'application de JH à des larves du dernier stade et même des prénymphe âgées de moins de 24 heures entraîne leur développement dans le sens reine. Chez Bombus terrestris c'est pendant le premier stade larvaire qu'a lieu la détermination des castes. La différenciation dans le sens ouvrière ne peut plus être modifiée ni par la quantité de nourriture, ni par l'application de JH. Le développement

dans le sens reine peut être influencé vers la voie ouvrière par la présence d'une reine très dominante dans la société, et ce, jusque pendant le dernier stade larvaire.

Il est intéressant de connaître l'influence des ecdystéroïdes et des JH, les deux grandes familles d'hormones du développement chez les insectes, sur la détermination des castes. Dans un premier temps, on peut rechercher des corrélations temporelles entre les variations des hormones circulantes et certains aspects du développement. Chez les Hyménoptères sociaux, de telles recherches ont été faites chez l'Abeille (COPIJN et al., 1979; WIRTZ, 1973; LENSKY et al., 1978; REMBOLD, 1976; REMBOLD et HAGENGUTH, 1980) et, en ce qui concerne les seuls ecdystéroïdes, chez deux espèces de Fourmis SUZZONI et al., 1980, 1983). Les résultats de ces investigations montrent que les reines ont des taux de JH plus élevés au dernier stade larvaire; mais les courbes obtenues par les différents auteurs ont des profils malaisément comparables probablement à cause des différences dans les méthodes (Galleria test, dosage radioimmunologique, dosage physico-chimique), dans les échantillons (hémolymphe ou broyats totaux) ou même dans l'unité à laquelle les taux d'hormones sont rapportés: (poids, volume ou bien nombre d'animaux). Des différences entre castes ont été également montrées qui concernent les ecdystéroïdes. Déjà à l'aide du test biologique Galleria, RÖSELER, (1977) avait trouvé un taux de JH plus élevé dans les prénymphe de reines de *Bombus hypnorum*, tandis que chez *Bombus terrestris* il observait, au contraire, un taux très légèrement plus élevé chez les prénymphe ouvrières.

Pour améliorer notre compréhension des interactions entre déterminisme des castes et activité hormonale, nous avons mesuré les taux de JH et d'ecdystéroïdes circulants pendant le développement prénymphe (c'est à dire depuis le filage du cocon jusqu'à la mue nymphale) des deux castes femelles des deux espèces de Bourdons précitées. Des méthodes radioimmunologiques ont été employées pour déterminer les JH (STRAMBI et al., 1981) et les ecdystéroïdes (DE REGGI et al., 1975) à partir d'un même échantillon d'hémolymphe provenant d'une seule prénymphe.

MATERIEL ET METHODES

Bourdons: Chaque colonie est élevée à partir d'une reine et maintenue en cage à 22°-30° C. Un contrôle du couvain est effectué au moins 4 fois par jour pour noter les larves qui commencent à filer, les cocons sont marqués individuellement par des points de couleur.

Hémolymphe: Elle est collectée et son volume mesuré dans un capillaire de verre après incision du vaisseau dorsal et immédiatement congelée. L'hémolymphe de prénymphe proches de la mue nymphale contenant du matériel cellulaire provenant de l'hystolyse des tissus est d'abord centrifugée à 0° C et 6000 RPM.

Extraction: A chaque échantillon d'hémolymphe soit environ 50 à 150 µl suivant la taille des larves on ajoute environ trois fois son volume de méthanol. Après sonication, le mélange est lavé trois fois par de l'hexane. Après chaque centrifugation, l'épiphase hexane est transférée dans un tube de verre. L'hypophase Méthanol-eau lavée trois fois à l'hexane est transférée dans un tube d'Eppendorf et évaporée. Après reprise par du tampon citrate 0.1 M (pH 6.1) et ajout d'un dérivé marqué à 1125 I, les échantillons sont incubés contre des anticorps anti-ecdysone suivant

la méthode de Reggi et al. (1975). Les extraits hexane sont traités par la méthode de Strambi et al. (1981). Après évaporation sous azote, et reprise par du dioxane sulfurique, les échantillons sont incubés à 40°C pendant 16h. de façon à transformer la JH en sa forme diol par rupture du groupement epoxy. Les diols sont repris par l'hexane. Les phases hexane sont lavées par une solution de soude (0,01 N) et déposées sur une plaque de chromatographie en couche mince. La plaque est développée par un mélange hexane/dioxane (7/3) les bandes correspondant à la migration des diols sont éluées par de l'acétone. Cette dernière, diluée à l'eau, est lyophilisée. Le lyophilisat est repris au tampon citrate 0,01 M, dont une aliquote additionnée de dérivé marqué à l'¹²⁵I sera incubée avec des anticorps anti-JH. Après que le dosage ait été effectué, les restes de chaque échantillon de tampon contenant encore de la JH-diols ont été lavés à l'hexane et tous les extraits d'une même espèce ont été mélangés, desséchés puis repris par un mélange acetonitrile/eau (1/1) avant d'être analysés par HPLC sur colonne Merck RP 18 (25 cm/0,4 cm, taille des particules 5µm) avec un gradient linéaire de CH₃CN/H₂O (de 45% à 65% en 30 mn) suivi par une purge de CH₃CN (1 ml/mn pendant 10 mn). Nous avons collecté une fraction par minute soit au total 40 fractions par échantillon (un échantillon pour chaque espèce) qui ont été soumises chacune à un dosage radioimmunologique.

RESULTATS

Bombus terrestris: (fig. 1 et 2) Le stade prénympgal est chez les ouvrières plus court d'environ 3 heures que chez les reines.

Ecdystéroïdes: dans les deux castes le taux des ecdystéroïdes circulants est bas au moment du filage du cocon. Chez les ouvrières, les taux s'accroissent après 10 heures et atteignent un pic à 40 heures. Chez les reines, la montée de la courbe ne commence guère que vers 20 à 30 heures, le pic a lieu après 60 heures. Dans les deux castes, les taux d'ecdystéroïdes retombent abruptement et sont très bas au moment de la mue nymphale.

JH: Les variations dans les taux de JH sont très parallèles à celles des Ecdystéroïdes. Chez les ouvrières, le taux commence à s'élever pendant les 10 premières heures et atteint un maximum à 40 heures. Dans l'hémolymphe des reines, la montée est retardée et le pic n'a lieu que vers 60 à 70 heures. Les valeurs des pics sont très voisines chez les ouvrières et les reines.

Bombus hypnorum: (Fig. 3 et 4) Le stade prénympgal est plus court que dans l'espèce précédente, mais on trouve également une durée de développement plus longue chez les prénympges de reines que chez les prénympges d'ouvrières.

Ecdystéroïdes: Chez les ouvrières le taux des ecdystéroïdes circulants s'élève significativement vers la 7ème heure pour culminer à 30 heures. Chez les reines de cet âge les ecdystéroïdes sont encore en quantité très faible, leur taux ne commence à s'élever que vers 40 heures le pic doit être localisé vers la 50ème heure.

JH: C'est dès après le filage du cocon que les taux de JH commencent à s'élever dans les deux castes. La variabilité des mesures individuelles est plus grande que chez *Bombus terrestris* et nous interdit d'attribuer à un âge précis le pic de JH des ouvrières. Par contre, chez les reines, le pic est assez bien localisé après

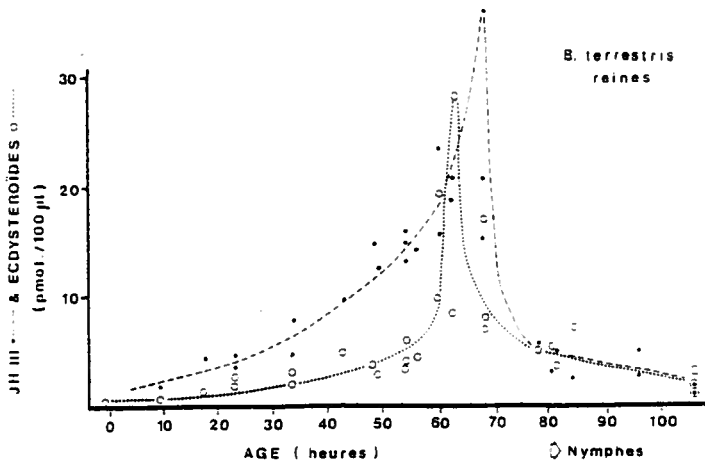


Figure 1: Taux de JH et d'ecdystéroïdes chez les prénymphe de reines de Bombus terrestris

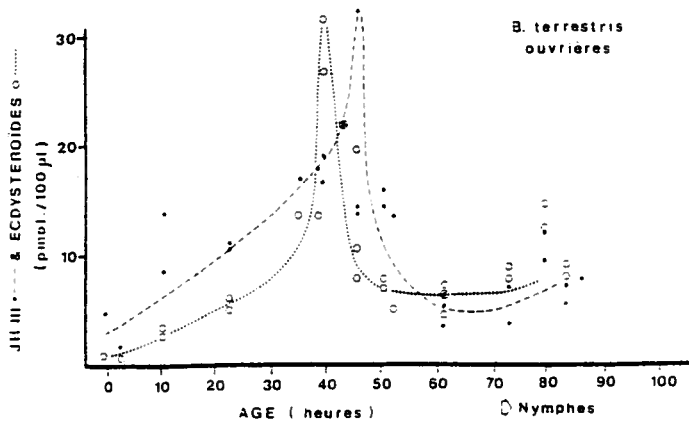


Figure 2: Taux de JH et d'ecdystéroïdes chez les prénymphe d'ouvrières de Bombus terrestris

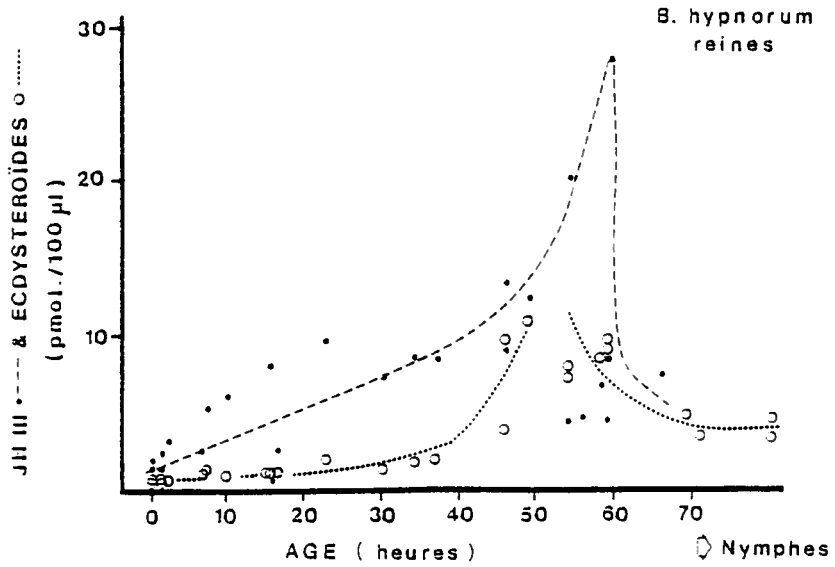


Figure 3: Taux de JH et d'ecdystéroïdes chez les prénymphe de reines de Bombus hypnorum

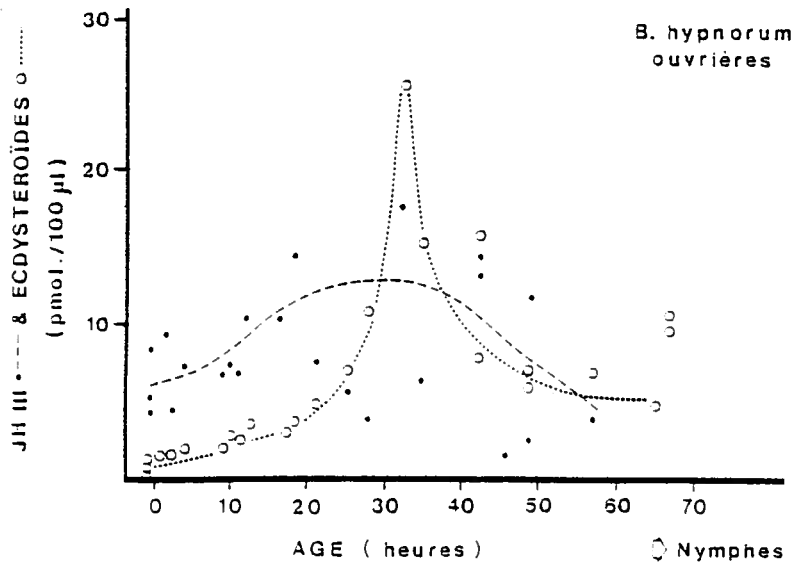


Figure 4: Taux de JH et d'ecdystéroïdes chez les prénymphe d'ouvrières de Bombus hypnorum

50 heures; il est plus tardif et atteint des valeurs supérieures à ce que l'on a pu mesurer chez les ouvrières.

JH et ecdystéroïdes décroissent à la fin du stade dans les deux castes.

Caractérisation de la JH de Bombus.

La séparation par HPLC des diols suivie d'une analyse radioimmunologique de toutes les fractions, la comparaison des chromatogrammes ainsi obtenus au chromatogramme témoin où l'on met en évidence les temps de rétention des diols tritiés des JH I, II et III, permettent de caractériser les produits immunoréactifs des deux espèces. La figure 5 montre clairement que les seuls produits immunoréactifs détectés comigrent avec le diol de la JH III (C16). (fig.5).

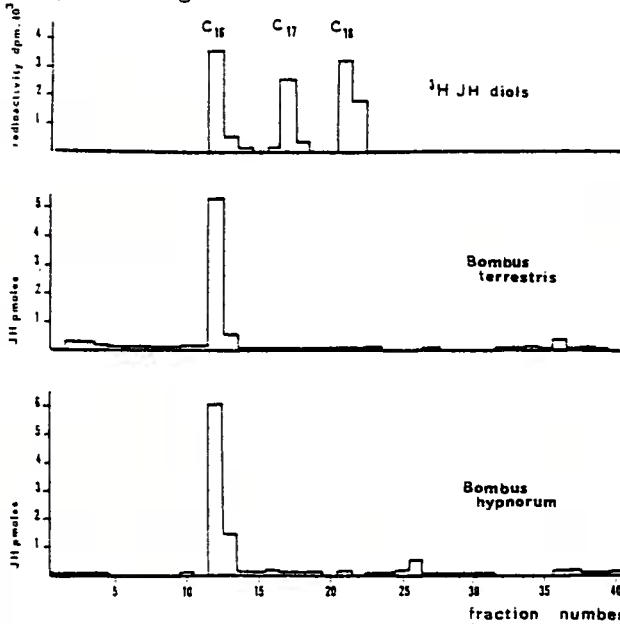


Figure 5: Séparation par HPLC des JH de l'hémolymphe de Bombus terrestris et de Bombus hypnorum. Comparaison avec des marqueurs tritiés chromatographiés dans les mêmes conditions.

Nous n'avons pas détecté d'immunoréactivité dans les fractions comigrant avec les diols de JH de poids moléculaire plus élevé (C17, C18). Le mélange préalable des échantillons provenant pour chaque espèce, des deux castes et prélevés tout au long du stade permet d'affirmer, puisqu'on ne trouve qu'un seul dérivé, qu'aucune différence qualitative n'existe entre les castes ni dans le décours temporel.

Les prénymphe des deux espèces de Bombus étudiées ici ne contiennent donc que de la JH III tant chez les reines que chez les ouvrières.

DISCUSSION

REMBOLD et HAGENGUTH (1980) par une méthode physico-chimique trouvent la JH III tout au long du développement de l'Abeille. En 1978, LENSKY et al. affirmaient la présence simultanée des JH I et III, leur dosage chez les prénymphe rendait compte de 5 fois plus de JH III que de JH I chez les reines, de 4 fois plus de JH I que de JH III chez les ouvrières. Chez les autres Apidae que sont les Bourdons, nous n'avons décelé que de la JH III. Les taux de JH et d'ecdystéroïdes montrent un pic très net au cours du stade prénymphe des deux castes chez les deux espèces. Les hormones circulantes disparaissent vers la fin du stade. De tels pics précédant la mue nymphale ont été décrits chez les Lépidoptères (LAGUEUX et al., 1976; VARJAS et al., 1976; HSIAO et HSIAO, 1977; MAUCHAMP et al., 1980), chez l'abeille (REMBOLD et HAGENGUTH, 1980) où la décroissance des taux avant la mue nymphale n'a pas été clairement montrée. La signification fonctionnelle de ces pics n'est pas connue.

Dans les deux espèces de Bourdons, il existe des différences dans les variations temporelles des taux de JH et d'ecdystéroïdes. Les taux de JH commencent à augmenter plus tôt que les taux d'ecdystéroïdes tandis que le pic de JH se situe quelques heures plus tard que le pic d'ecdystéroïdes. Dans les deux espèces, les deux hormones varient suivant un schéma très voisin, ce qui indique une coordination très précise entre les hormones dans le développement de la prénymphe.

On ne peut pas comparer ce phénomène avec ce qu'il advient chez l'abeille car, pendant tout le stade prénymphe, seuls 5 échantillons ont été dosés pour les deux castes par REMBOLD et HAGENGUTH (1980) et un seul point par caste par LENSKY et al. (1978). Chez les Lépidoptères, l'augmentation des ecdystéroïdes précède la retombée des JH. Mais on ne connaît rien sur des concentrations hormonales critiques capables d'induire des différences dans le développement, pas plus qu'on ne sait si le phénomène important est le pic ou l'accroissement qui le précède.

De nos résultats, on peut conclure que l'accroissement du taux de JH pourrait dans un premier temps activer le génome tandis que les ecdystéroïdes entraîneraient la transcription du programme induit par la JH comme cela a été proposé par KRISHNA-KUMARAN (1980). Dans le développement morphogénétique on pense que la JH stimule l'expression des gènes larvaires; dans l'optique de la différenciation des castes, la JH induirait la physiologie reproductrice et le comportement de reine comme l'a montré RÖSELER (1977) pour *Bombus hypnorum*. Des différences spécifiques des castes existent pour les deux hormones. Chez les ouvrières, les taux des deux hormones commencent à augmenter plus tôt que chez les reines et le pic se situe vers le milieu du stade prénymphe, tandis que chez les reines il a lieu environ trente heures plus tard soit vers les 2/3 ou les 3/4 de la durée du stade. Cette différence reflète sans doute un programme temporel spécifique des castes et lié à leur différenciation. Les taux maximum des deux hormones sont du même ordre de grandeur chez les reines et les ouvrières de *Bombus terrestris*. Chez *Bombus hypnorum* le pic de JH est plus élevé chez les reines que chez les ouvrières, ce

qui avait été montré grâce à un test biologique par RÖSELER (1977). Cela pourrait être rapproché du fait que des prénymphe de *Bombus hypnorum* engagées dans la différenciation en ouvrières peuvent être orientées vers la caste reine par l'application de JH (RÖSELER, 1976,1977).

Références

- ASENCOT M., LENSKY Y., 1976.- The effect of sugar and juvenile hormone on the differentiation of the female honeybee larvae (*Apis mellifera*) to queens. *Life Sci.*, 18, 693-700.
- COPIJN G.M., BEETSMA J., WIRTZ P., 1979.- Queen differentiation and mortality after application of different juvenile hormone analogues to worker larvae of the honeybee (*Apis mellifera* L.) *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, C 82, 29-42.
- DE REGGI M.L., HIRN M.H., DELAAGE M.A., 1975.- Radioimmunoassay of ecdysone: an application to *Drosophila* larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 66, 1307-1315.
- DE WILDE J., BEETSMA J., 1982.- The physiology of caste development in social insects. *Adv. Insect Physiol.*, 16, 167-247.
- GOEWIE E.A., BEETSMA J., 1976.- Induction of caste differentiation in the honeybee (*Apis mellifera* L.) after topical application of JH III. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet.*, C 79, 466-469.
- HSIAO T.H., HSIAO C., 1977.- Simultaneous determination of molting and juvenile hormone titers of the greater waxmoth. *J. Insect Physiol.*, 23, 89-93.
- KRISHNAKUMARAN A., 1980.- Reprogramming in insect epidermal cells. Role of hormones. *Int. Conf. on Regulation of Insect Development and behaviour*. Karpacz Poland., 451-462.
- LAGUEUX M., PERRON J., HOFFMANN J.A., 1976.- Ecdysone metabolism and endogenous moulting hormone titre during larval-pupal development in *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.* 22, 57-62.
- LENSKY Y., BAEHR J.C., AND PORCHERON P., 1978.- Dosages radioimmunologiques des ecdysones et des hormones juvéniles au cours du développement post-embryonnaire chez les ouvrières et les reines d'abeille (*Apis mellifera* L. var. *Ligustica*). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 287, 821-824.

- MAUCHAMP B., LAFONT R., PENNETIER J.L., DOUMAS J., 1980.- Detection and quantification of the juvenile hormone I during the post-embryonic development of *Pieris brassicae* L. *Int. Conf. on Regulation of Insect development and Behaviour*, Karpacz, Poland, 199-206.
- REMBOLD H., 1976.- The role of determinant in caste formation in the honeybee. In: "*Phase and caste determination in insects*". Ed. M. LÜSCHER, Oxford., 21-34.
- REMBOLD H., HAGENGUTH H., 1980.- Modulation of hormone pools during postembryonic development of the female honeybee castes. *Int. Conf. on regulation in Insect development and Behaviour*. Karpacz, Poland 427-440.
- RÖSELER P.F., 1976.- Juvenile hormone and queen rearing in Bumblebees. In: "*Phase and caste determination in insects*". ed. M. LÜSCHER, Oxford, 55-61.
- RÖSELER P.F., 1977.- Endocrine control of polymorphism in bumblebees *Proc. 8th Int. Congr. IUSSI*, Wageningen, 22-23.
- STRAMBI C., STRAMBI A., DE REGGI M.L., HIRN M.H., DELAAGE M.A., 1981.- Radioimmunoassay of Insect juvenile hormones and of their diol derivatives. *Eur. J. Biochem.*, 118, 401-406.
- SUZZONI J.P., PASSERA L., STRAMBI A., 1980.- Ecdysteroid titre and caste determination in the ant, *Pheidole pallidula* (Nyl.) (Hym. Form.). *Experientia*., 36, 1228-1229.
- SUZZONI J.P., PASSERA L., STRAMBI A., 1983.- Evolution of ecdysteroids during caste differentiation in the Ant *Plagiolepis pygmaea*. *Physiol. Entomol.*, 8, 93-96.
- VARJAS L., PAGUIA P., DE WILDE J., 1976.- Juvenile hormone titres in penultimate and last instar larvae of *Pieris brassicae* and *Barathra brassicae* in relation to the effect of juvenoid application. *Experientia* 32, 249-251.
- VELTHUIS H.H.W., VELTHUIS-KUPPELL F.M., 1975.- Caste differentiation in a stingless bee *Melipona quadrifasciata* Lep. influenced by juvenile hormone application. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wet. C* 78, 31-34.
- WIRTZ P., 1973.- Differentiation in the honeybee larvae. *Meded. Landbouwhogeschool*, Wageningen, 73-75.

