

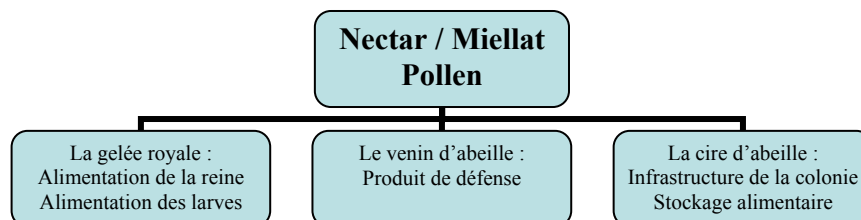
Les produits de sécrétion et leurs rôles dans la colonie d'abeilles

*Dr. bioch. Cristina Mateescu
Directrice de Recherche en Apithérapie
Institut de Recherche Apicole
Bucarest - Roumanie*

Produits de sécrétion

- La gelée royale
- Le venin d'abeilles
- La cire

Les rôles des produits de sécrétion



Les acides aminés spécifiques sont nécessaires :

- pour la croissance ;
- pour le développement normal ;
- pour la reproduction ;
- pour l'élevage du couvain.

Les nécessités en protéines et en acides aminés pour les reines adultes et pour les larves de reines sont toujours inconnues, mais heureusement on a des connaissances sur la composition chimique de leur nourriture de base, la gelée royale.

Gelée royale – Définition



- La gelée royale est un produit crémeux sécrété par les abeilles nourrices pour nourrir la reine, la larve de reine et les autres jeunes larves.
- Elle est entièrement synthétisée par les abeilles dans les glandes hypopharyngiennes et mandibulaires. Elle est dérivée des protéines et des nutriments présents dans le pollen ingéré par les abeilles nourrices.
- La gelée royale est une émulsion riche en protéines, sucres et lipides dans une base aqueuse et sa composition est quelque peu fluctuante.
- Les protéines n'ont pas de propriétés spéciales et surtout ont la même fonction d'offrir à la larve de reine en voie de

développement une source directement assimilable de protéines. En ce qui concerne les matières protéiques Howe et al. (1985) signalent 17 aminoacides standard et 5 non identifiés. Ces acides aminés sont soit libres, soit impliqués dans des protéines.

- Les restes de la composition, à l'exception de lipides, sont orientés vers l'offre d'une balance de nutriments pour les individus qui la consomment.
- Les lipides ne contiennent pas les triglycérides et les diglycérides normaux.
- Sa composition globale est la suivante :
 - o humidité 67,1% ;
 - o protéines 11,8% ;
 - o lipides et substances associées 4,3% ;
 - o vitamines sucres 12,02%.

Gelée royale – Composition chimique

- Parmi les vitamines, celles du groupe B sont particulièrement bien représentées (thiamine, riboflavine, niacine, acide pantothénique, pyridoxine, acide folique, choline, vitamine B 12, biotine). Helleu (1956) a montré la présence de mésoinositol et Butenandt & Rembold (1958) y trouvèrent de la biopéridine.
- La fraction lipidique comprend des composés fort variés, mais le principal élément est l'acide 10 hydroxy-2décénoïque qui a été identifié par divers chercheurs avec plus ou moins de précision en fonction des techniques utilisables. En 1979, Boch y a identifié aussi l'acide octanoïque et différents acides volatils. En 1962, Pain et al. y ont caractérisé les acides: adipique, pimélique, subérique et le 24-méthylène-cholestérol (dans la gelée royale et la gelée des ouvrières). Beaucoup plus récemment Lercker et al. (1982) ont identifié pas moins de 31 acides organiques libres dans la gelée royale et 7 stérols.
- Les sucres sont connus exister dans la gelée royale depuis les recherches de Planta (1888-1889). Ils se composent essentiellement de glucose 9,76%, de fructose 11,32% et un peu de saccharose 0,94%, l'analyse précise a été donnée par Simo et Christensen (1962).

Les différentes gelées d'alimentation des larves royales, mâles et ouvrières

- Les larves royales se développent plus lentement au début que les larves ouvrières. Leurs cellules sont fermées le 5^{ème} jour mais, avant l'obturation, les nourrices y placent une bonne réserve de gelée royale si bien que la larve s'alimentera jusqu'au 6^{ème} jour (inclus).
- Les larves d'ouvrières sont operculées le 6^{ème} jour. Elles sont alimentées jusqu'au 5^{ème} jour, soit 1 jour de moins que les larves royales.
- Les larves de mâles sont nourries 6 jours, elles aussi, mais d'une bouillie bien différente des larves royales.

L'origine de la gelée royale

- La meilleure étude que l'on possède actuellement sur l'origine de la gelée royale est l'œuvre de Jung-Hoffmann (1960-1966) qui a étudié avec beaucoup de soin l'alimentation des différentes catégories de larves de la ruche.
- D'après cet auteur, la gelée royale est en fait composée de 2 phases identifiables par la seule observation :

- 1 phase blanche et 1 phase claire ;
- la phase blanche provient des glandes mandibulaires et hypopharyngiennes ;
- la phase claire est un mélange du contenu du jabot et des glandes hypopharyngiennes.

Les gélées pour les larves

- Pour la larve de reine : le rapport phase blanche/phase claire est de 50/50 environ, mais en fait jusqu'à 3 jours, elle reçoit plus de sécrétion blanche, et à partir de 4 jours plus de sécrétion claire. La sécrétion blanche ne contient pas de sucre et son pH=4, ce qui est très voisin de celui des glandes mandibulaires (3,9), alors que celui de la sécrétion claire 4,5 se rapproche de celui des glandes hypopharyngiennes (5,0) et cette phase-là contient du sucre. La teneur en protéines de la phase blanche est de 14% et celle de la phase claire 10%.
- Pour les larves d'ouvrières : le premier jour, la composition est : 20% de phase blanche et 80% de phase claire. Le deuxième jour : 27% de phase blanche et 73% de phase claire, ceci en été.
- En fait, la composition de la gelée royale est différente, dès le départ, entre reine et ouvrières. Pour les ouvrières, elle varie en fonction de la saison. De plus, à partir du 3^{ème} jour, les larves d'ouvrières ne reçoivent pratiquement plus de phase blanche. Leur nourriture se compose alors de 65% de phase claire, le reste étant un composé riche en pollen.

Fractions de gélées alimentaires



- Par électrophorèse de gélées alimentaires de différentes larves, Patel et al. (1960) ont montré que la gelée royale contient 4 fractions identiques quel que soit l'âge de la larve de reine alors que les gélées d'ouvrières et de mâles contiennent 4 fractions comparables à celles de la reine seulement chez les jeunes.
- Les vieilles larves de mâles et d'ouvrières n'ont plus qu'une gelée à 2 fractions.

Les sucres dans l'alimentation des larves

- Enfin, un autre résultat surprenant concerne la teneur en sucres des différentes gélées. Browers (1984) étudiant les sucres des gélées de larves d'âge connu montre que la gelée royale présente une teneur en sucre relativement constante quel que soit l'âge de la larve. Le sucre prépondérant est le glucose, suivi du fructose, le saccharose étant en moindre quantité. Ceci rappelle la composition du miel.
- La gelée de mâle et celle d'ouvrière présentent des taux de glucose/fructose/saccharose relativement comparables à ceux de la gelée de reine pendant les premières 48 heures.
- Puis à partir de la 54^{ème} heure pour les ouvrières et de la 66^{ème} heure pour les mâles, on assiste à une inversion des taux de glucose/fructose, le fructose devenant prépondérant.
- Enfin, à partir de la 84^{ème} heure pour les ouvrières et de la 108^{ème} heure pour les mâles, les taux glucose/fructose augmentent considérablement (mais pas le saccharose), ceci correspond à l'ajout beaucoup plus considérable de miel à la pâte larvaire.

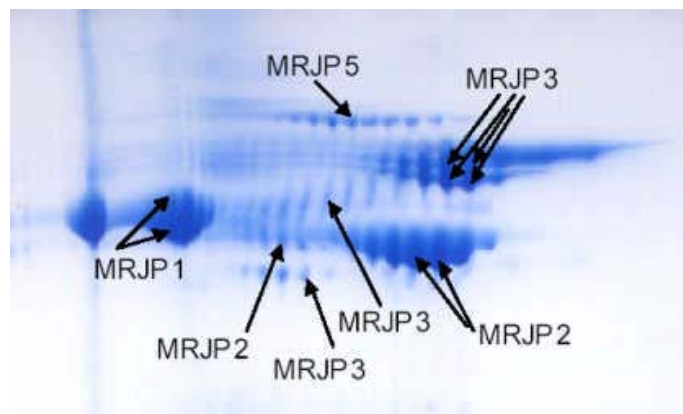
Les taux de glucides dans les gelées

- L'inversion des taux de glucose/fructose n'a pas encore été expliquée. Dans une moindre mesure, la disproportion entre glucose/fructose et saccharose dans les nourritures des larves jeunes ne s'explique guère, non plus.
- Pour le moment, il n'existe pas d'autres travaux permettant de confirmer ces résultats. Les seules recherches dont nous disposons concernent seulement la quantité de sucre total dans les nourritures de larves à différents âges.
- Ces quantités sont toutes en état d'une teneur en sucres plus grande dans la gelée royale que dans les gelées de jeunes larves de mâle et d'ouvrières, puis d'une augmentation remarquable des sucres dans les nourritures de ces mêmes larves lorsqu'elles vieillissent.
- La teneur en sucre de ces différentes gelées a une importance pour le déterminisme des castes.

Les protéines majeures de la gelée royale

- Une partie importante des protéines de la GR (environ 90 %) est représentée par un groupe de cinq protéines dénommées protéines majeures de la GR qui, d'après la forte homologie séquentielle (identique à 72 %), peuvent être classées dans une même famille de protéines et jouer un rôle dans la nutrition des larves.
- D'autre part, les protéines de la GR de faible poids moléculaire et ses peptides pourraient jouer un rôle dans la défense de l'abeille contre les agents pathogènes.
- L'activité antimicrobienne des peptides de l'abeille a été testée principalement contre des bactéries pathogènes d'importance générale et très peu d'efforts ont été dirigés vers la recherche de leur efficacité contre des bactéries ou des champignons pathogènes pour l'abeille.

Les protéines majeures de la gelée royale SDS-PAGE électrophorèse



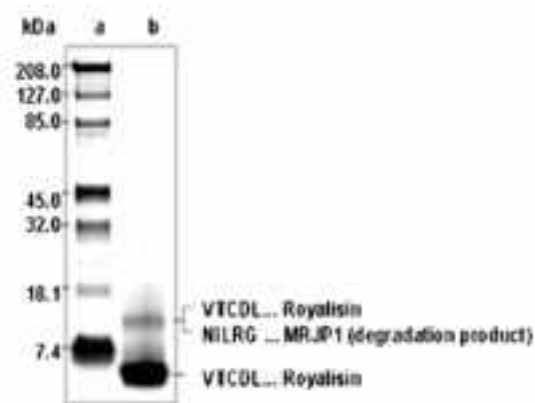
Royalisine - Fraction peptidique de la gelée royale

- Une fraction peptidique a été isolée de la gelée royale par la méthode de dialyse double en milieu acide. La séquence N-terminal du peptide majeur de la fraction est V-T-C-D-L-L-S-F-K-G. Cette séquence correspond à la structure du peptide de défense de la gelée royale – la royalisine – au poids moléculaire de 5523 Da. Ce peptide présente une action antibactérienne contre les bactéries Gram-positives. Les

tests de diffusion en agar ont montré que la fraction peptidique montre un effet inhibiteur contre l'agent pathogène de l'abeille (*Paeni*)*bacillus larvae*, l'agent pathogène principal de la loque américaine, ainsi que contre d'autres bactéries Gram-positives comme *Bacillus subtilis* et *Sarcina lutea*.

- De plus, la fraction peptidique présente un effet anti-fongique contre *Botrytis cinerea*. Ceci est la première évidence de l'effet antibiotique de la royalisine contre ce puissant pathogène. La procédure est très simple et n'a pas besoin de techniques de séparation trop sophistiquées. A la base est la dialyse de la gelée royale en utilisant des membranes aux pores de différentes dimensions, qui permettent la séparation de composants aux poids moléculaires de moins de 2kDa, entre 2 kDa et 10 kDa, et plus de 10 kDa.

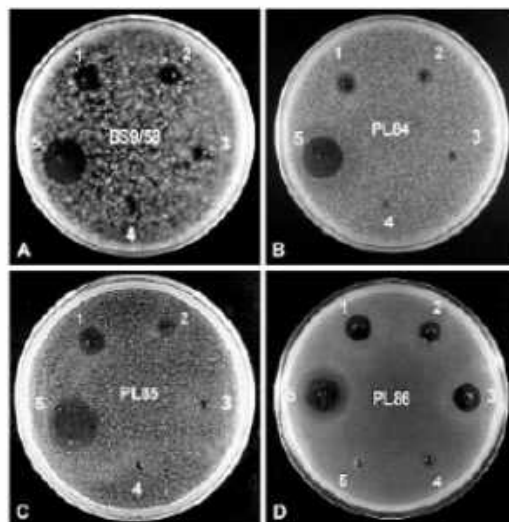
Royalisine - Fraction peptidique de la gelée royale



L'action antibactérienne de la royalisine

Le test de diffusion antibactérienne sur les plaques d'agar de la fraction de royalisine :

- *Bacillus subtilis*
- *Paenibacillus larvae larvae* ATCC 5084
- *Paenibacillus larvae larvae* ATCC 5085
- *Paenibacillus larvae larvae* ATCC 5086



La concentration protéique de la fraction de royalisine pour les plaques A, B, C :

- Position (1) – 108 μg /ml
- Position (2) – 54 μg /ml
- Position (3) – 27 μg /ml
- Position (4) – 5,4 μg /ml
- Position (5) – tétracycline 50 μg /ml

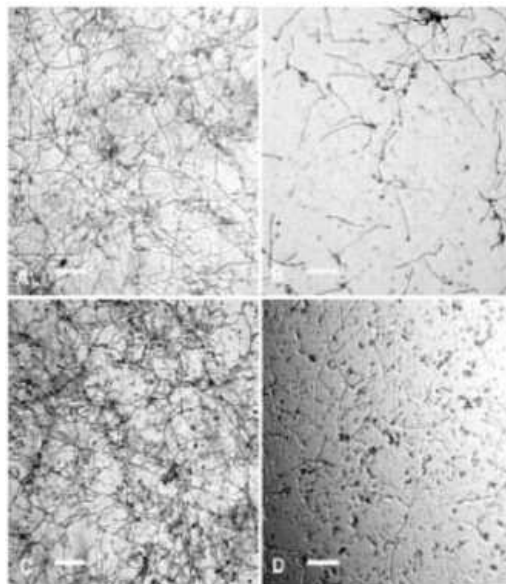
Pour la plaque D :

- Position (1) – 108 μg /ml
- Position (2) – 54 μg /ml
- Position (3) – 270 μg /ml
- Position (4) – 5,4 μg /ml
- Position (5) – 0,2 M –Tris-HCl pH 9,00
- Position (6) – tétracycline 50 μg /ml

Action anti-fongique de la gelée royale

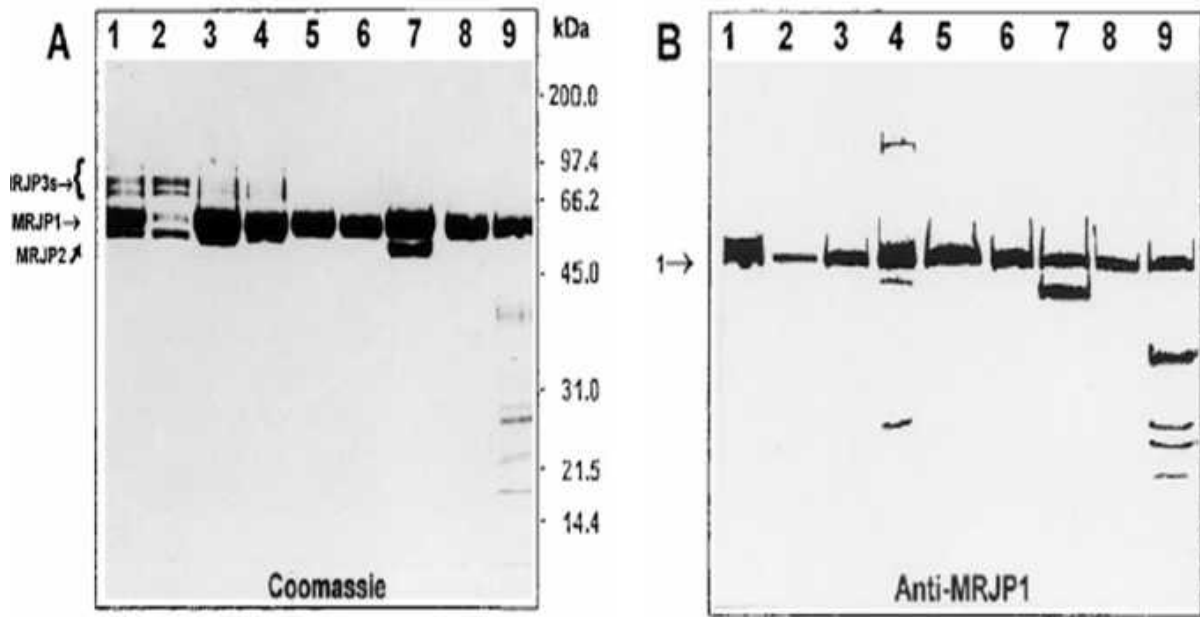
L'effet inhibiteur de la fraction royalisine sur la croissance du champignon *Botrytis cinerea* :

- (A) royalisine (27 mg.ml⁻¹) ;
- (B) royalisine (135 mg.ml⁻¹) ;
- (C) contrôle (croissance de *Botrytis cinerea* sans addition d'agent antifongique ;
- (D) peroxyde d'hydrogène (17 mg.ml⁻¹).



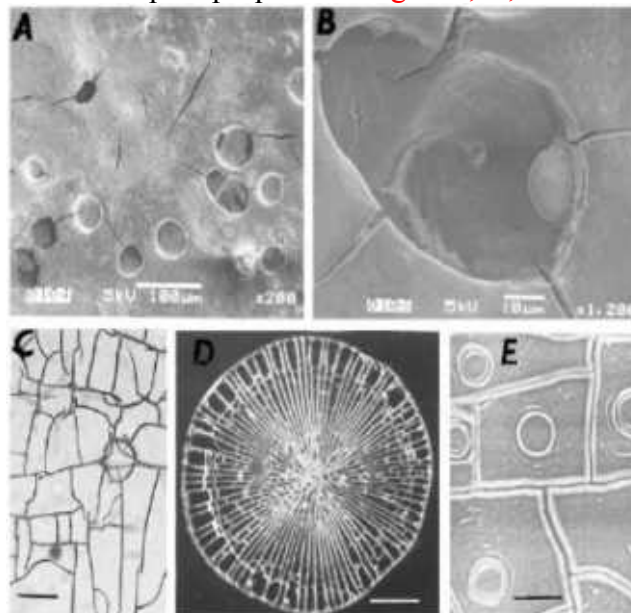
La petite ligne correspond à 25 μm .

Les fractions protéiques majeures de la gelée royale



Les protéines majeures de la gelée royale et leurs propriétés

- Une propriété intéressante de la forme oligomérique de la GRPP1 est sa capacité d'assemblage dans les solutions aqueuses.
- Des filaments réticulaires avec des particules globulaires formés dans le gel de GR ont été observés par microscopie optique. **Fig. 3 C, D, E ci-dessous :**



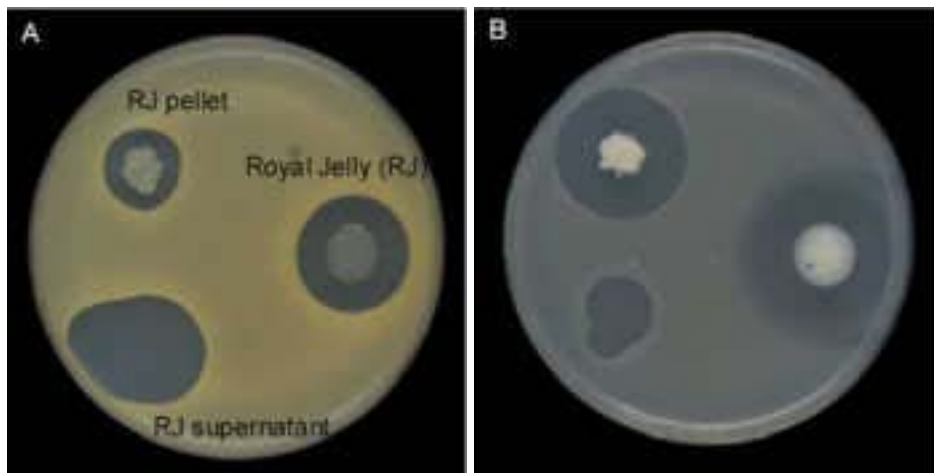
- On a montré que la protéine GRPP1 existe dans le miel, les pelotes de pollen et le pain de pollen (résultats non publiés).
- En dehors de la fonction nutritive, la GRPP1 dans la colonie des abeilles peut jouer un rôle particulier dans le traitement du pollen floral sous forme de pelotes.
- Les propriétés structurales, spécialement l'auto-assemblage flexible de la GRPP1 ainsi que la stabilité biochimique du gel de GR dans l'eau peuvent participer à la fixation du

pollen sur le corps de l'abeille et à la formation des pelotes de pollen lors de l'humidification des grains de pollen.

Propriétés inhibitrices de la gelée royale et ses fractions

bacteria	Royal Jelly (RJ) Twofold distance [mm]	RJ supernatant diameter [mm]	RJ pellet Twofold distance [mm]
1. <i>Micrococcus luteus</i> DSM 348	12±0	23.5±0.5	10 ±0
2. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> DSM 20193	11±1	18±0	6±0
3. <i>Lactobacillus plantarum</i> CTC 305	12±0	17±0	4±0
4. <i>Enterococcus faecalis</i> WS 1028	10±0	17±0	4 ±0
5. <i>Bacillus subtilis</i> DSM 347	16±0	16±0	18±2
6. <i>Erwinia carotovora</i> TMW 2.20	17±1	12.5±1.5	8±0
7. <i>Micrococcus varians</i> TMW 2.121	10±2	13.5±0.5	7±1
8. <i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	18±0	13±0	13±1
9. <i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. diacetylactis</i> LTH 2034	13±1	11.5±0.5	6±0
10. <i>Alcaligenes eutrophus</i> DSM 531T	6±0	12±0	6±0
11. <i>Escherichia coli</i> K12JM83	6 ±0	12±0	3±1
12. <i>Pseudomonas fluorescens</i> DSM 50106	6±0	11 ±0	2±0

L'action inhibitrice de la gelée royale contre *M.luteus* et *B.subtilis*



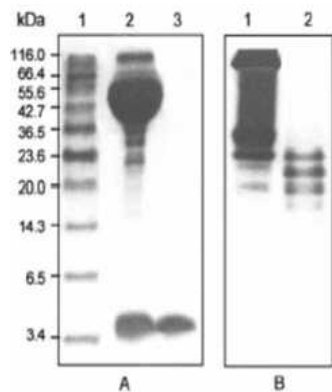
Les protéines majeures de la gelée royale et leurs propriétés

- Les différents peptides et/ou protéines de faible poids moléculaire participent à l'activité biologique.
- L'activité biologique des fractions protéiniques varie selon la saison, et en conséquence, dépend de l'origine botanique des échantillons de gelées royales, comme observé pour l'activité des gelées elles-mêmes.
- Il est important de mentionner qu'une corrélation significative a pu être établie entre l'origine botanique des espèces de pollen et l'activité biologique des gelées royales résultantes.
- Les tests de criblage antibiotique réalisés sur la gelée royale et ses fractions protéiniques ont montré de fortes activités inhibitrices contre des bactéries pathogènes nosocomiales, plusieurs champignons et virus. Au total, plus que 150 bactéries, plusieurs champignons et virus ont été testés.
- L'activité inhibitrice contre les bactéries résistantes aux antibiotiques offre, de ce fait, un grand potentiel d'applications.
- Les flavonoïdes sont des cofacteurs de l'activité antimicrobienne dans la gelée royale.

Protéines et peptides de la gelée royale

- L'analyse par MALDI-TOF-MS de la gelée royale a montré que la partie prépondérante des peptides et protéines de faible poids moléculaire de la gelée royale provient de la coupure protéolytique des protéines majeures de haut poids moléculaire. Les tests d'activité antibactérienne montrent que ce sont principalement les peptides courts qui sont biologiquement actifs. Ces peptides proviennent bien de la coupure protéolytique des protéines majeures de la gelée royale. D'autres petits peptides ne sont pas liés aux protéines majeures de la gelée royale car ils ne présentent aucune homologie de séquence avec ces dernières.
- Une iso-forme modifiée de la royalisine a été isolée de l'hémolymphe de l'abeille. La défensine de l'abeille a un seul acide aminé remplacé : l'arginine (dans la protéine de défense) avec le tyrosine (dans la royalisine) à la position 50.
- Les autres peptides antibactériens actifs du système humoral immunitaire de l'abeille (hémolymphe) sont l'apidaecine, l'abaecine et l'hymenoptaecine avec 18, 34 et 93 acides aminés. Il est donc clair que la gelée royale joue un rôle important dans la défense contre les invasions bactériennes chez les abeilles et le couvain.
- La gelée royale contient un grand nombre de protéines natives et de dérivés protéiniques, dominé par 4 familles de protéines majeures de haut poids moléculaire. Ces protéines majeures de la gelée royale (MRJP, pour Major Royal Jelly Protein) représentent plus de 80 % de la masse totale des protéines.
- Parmi les protéines majeures de la gelée royale, l'albumine (MRJP 1) et MRJP 2 se manifestent au niveau du cerveau (les centres de mémoire) de l'abeille adulte. Un petit peptide – l'apisimine – au poids moléculaire de 5540,4 Da a été identifié au niveau de cerveau des abeilles nourrices et butineuses.

L'apisimine de la gelée royale



Caractérisation électrophorétique de l'apisimine :

- A – SDS-PAGE (électrophorèse en gel de polyacrylamide avec sodium dodécylsulphate) – position 3 –apisimine
- B – PAGE - position 2 l'apisimine :
- Détection par coloration avec Coomassie Blue G-250

La fraction lipidique de la gelée royale

- Le contenu lipidique est unique et une caractéristique très intéressante de la gelée royale.
- La fraction lipidique contient environ 80 – 90% (du poids sec) d'acides gras libres aux structures peu habituelles. Ce sont surtout des hydroxy- acides gras de 8 à 10 atomes de carbone ou d'acides dicarboxyliques, contrairement aux acides de 14 à 20 atomes de carbone dans les acides gras trouvés dans les matériaux d'origines animale ou végétale. Ces acides gras sont pour la plupart, responsables des propriétés biologiques de la gelée royale. L'acide principal est l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque, suivi par son équivalent saturé, l'acide 10-hydroxydécénoïque.
- La fraction lipidique de la gelée royale contient aussi quelques lipides neutres, des stérols (y compris le cholestérol) et une fraction d'hydrocarbures similaires aux extraits de cire d'abeilles.

La gelée royale – l'acide 10-HD

L'acide organique, le 10 – hydroxy-2-décénoïque (10-HAD) a été isolé de la fraction lipidique de la gelée royale. Cet acide présente une action antibactérienne et antifongique reconnue :

- son activité contre *Micrococcus pyogenes* représente $\frac{1}{4}$ de l'activité de la pénicilline ;
- contre *Escherichia coli*, l'activité de l'acide 10-hydroxy-2-décénoïque n'est que de $\frac{1}{5}$ de l'activité de la chlorotétracycline.

Les minéraux

- La présence de composés inorganiques dans la gelée royale est très intéressante à plusieurs titres. Les éléments traces jouent de nombreuses fonctions biologiques dont toutes ne sont pas encore connues.
- Dans des gélées royales différentes, les concentrations de plusieurs éléments majeurs et de traces sont remarquablement constantes. A l'évidence, des ajustements homéostatiques de plusieurs éléments majeurs et de traces sont opérés dans la gelée royale par les abeilles nourrices pour les besoins nutritionnelles des larves.
- Par exemple : les concentrations de phosphore (P) et soufre (S) dans la gelée royale sont ajustées pour les besoins des larves. Le phosphore est un élément de structure pour les acides nucléiques ainsi qu'un élément de construction pour les larves. Les

concentrations de soufre sont liées à la présence de ponts disulfuriques dans les protéines.

Les vitamines

- La concentration des vitamines est très élevée, spécialement pour le groupe de vitamines B, B1, B2, B3 et B6 ainsi que pour les vitamines PP et E.
- Leur rôle est celui de biocatalyseur dans les réactions métaboliques. Les vitamines sont des co-facteurs enzymatiques très importants.

La cire d'abeille



- La cire est une matière sécrétée par les glandes cirières de l'abdomen de l'abeille.
- Pour les abeilles, les alvéoles hexagonales sont des berceaux à larves (le couvain) et un grenier à nourriture.
- La cire d'abeille est de nature lipidique. Elle renferme des hydrocarbures saturés, des acides ou hydroxy-acides, des alcools, des pigments provenant surtout du pollen et de la propolis, ainsi que des substances provenant du couvain, etc.

Le venin d'abeilles, les phéromones

- Les peptides du venin d'abeilles, surtout la mellitine, le composant majeur, sont reconnues pour leurs activités biologiques.
- Melittin (Mel) - GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH2
- Propriétés antibactériennes.
- *Apis cerana* possède une phéromone très importante pour signaler le danger (50 fois plus concentré que dans les venins de l'abeille européenne).

Bibliographie

1. Resistance to American foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior Marla SPIVAK*, Gary S. REUTER *Apidologie* 32 (2001) 555–565
2. Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor - Bíliková K., Gusui W., Simuth J.- *Apidologie* 32 (2001), 275–283
3. Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood, Crailsheim K., Riessberger-Gallé U. *Apidologie* 32, 91–103. (2001)
4. Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*, Feldlaufer M.F., Lusby W.R., Knox D.A., Shimanuki H. *Apidologie* 24, 89–94. (1993)
5. Gochnauer T.A. (1951) Drugs fight foulbrood disease in bees, *Minn. Home Fam. Sci.* 9, 15
6. Kochansky J., Knox D.A., Feldlaufer M., Pettis J.S. (2001) Screening alternative antibiotics against oxytetracycline-susceptible and -resistant *Paenibacillus* larvae, *Apidologie* 32, 215–222

7. Rose R.O., Briggs J.D. (1969) Resistance to American foulbrood in honey bees. IX. Effects of honey bee larval food on the growth and viability of *Bacillus* larvae, *J. Invertebr. Pathol.* 13, 74–80
8. Your Bees Are What You Feed Them, Charlie Stevens - *Bee Biz* No. 9, February, 1999, pp. 12-14
9. Press Releases Alternative energy carrier - Amino acid as a fuel for honey bees Graz/Vienna (FWF)
INRA, EDP Sciences, DIB, AGIB 2003 Free amino acids in the haemolymph of honey bee queens (*Apis mellifera* L.) N. Hrasnigg, B. Leonhard, K. Crailsheim
10. *Apidologie* 32 (2001) 275–283 - Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor - Katarína BÍLIKOVÁ*, Gusui WU^b, Jozef S LIMÚTH
11. Nectar, miellat, pollen et environnement... P. SCHWEITZER L'abeille de France
12. Slimúth J. (2001) Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly, *Apidologie* 32, 69–80
13. Fujiwara S., Imai J., Fujiwara M., Yaeshima T., Kawashima T., Kobayashi K. (1990) A potent antibacterial protein in royal jelly, *J. Biol. Chem.* 265, 11333–11337
14. Hanes J., Slimúth J. (1992) Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.), *J. Apic. Res.* 31, 22–26
15. Otvos L.J.R. (2000) Antibacterial peptides isolated from insects, *J. Peptide Sci.* 6, 497–511
16. Schägger H., Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa, *Anal. Biochem.* 166, 368–379
17. The flow of jelly within a honeybee colony - Crailsheim, K— *J. Comp. Physiology B.*, 162, 681-689 (1992)
18. Determination and changes of free amino acids in royal jelly during storage - Emanuele Boselli, Maria Fiorenza Caboni, Anna Gloria Sabatini, Gian Luigi Marazzan and Giovanni Lercker *Apidologie* 34 (2003) 129-137
19. Storage proteins in winter honeybees – G.W.Otis, Wheeler D.E., N.Buck, H.R.Matilla *Apiacta* 38 (2004) 352-357
20. Nourrisment de l'abeille - OPIDA - Michel Bocquet
21. Schmitzová J., Klaudivy J., Albert S I., Schröder W., Schrockengost W., Hanes J., Júdová J., Slimúth J. (1998) A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L., *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 1020–1030

22. Chen I.C., Chen S.Y. (1995) Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions, *Food Chem.* 54, 195–200
23. Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Tempst P. (1993) Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*), *J. Biol. Chem.* 268, 7044–7054
24. Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989) Apideacins: antibacterial peptides from honeybees, *EMBO J.* 8, 2387–2391
25. DIETZ, A.; LAMBREMONT, E. N. (1970) Caste determination in honey bees. II. Food consumption of individual honey bee larvae determined with ³²P-labelled royal jelly. *Ann. ent. Soc. Am.* 63(5) : 1342-1345
26. BARBIER, M.; BOGDANOFSKY, D. (1961) Isolement et identification du méthylène-24 cholestérol, à partir des larves des reines d'abeilles et de la gelée royale. *C.r. Acad. Sci., Paris* 252 : 3497-3498
27. BROWN, W. H.; FELAUER, E. E.; FREURE, R. J. (1961) Some new components of royal jelly. *Can. J. Chem.* 39 : 1086-1089
28. BUTENDANDT, A.; REMBOLD, H. (1957) Über den Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene II. Isolierung, Konstitutionsermittlung und Vorkommen der 10-Hydroxy-A²-decaensäure. *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 308 : 284-289
29. Fatty acids – an alternative control strategy for honeybee diseases - Michael Hornitzky, RIRDC Publication No 03/028 RIRDC Project No DAN-193A
30. Feldlaufer, MF; Lusby, WR, Knox, DA; Shimanuki (1993a) Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *Apidologie* 24: 89-94
31. Feldlaufer, MF; Knox, DA; Lusby, WR.; Shimanuki (1993b) Antimicrobial activity of fatty acids against *Bacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood disease. *Apidologie* 24: 95-99
32. Galbraith, H; Miller, TB; Paton, AM; Thompson, JK (1971) Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of Applied Bacteriology* 34(4): 803-813
33. Kabara, JJ (1978) Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents . a review. In: *The Pharmacological Effects of Lipids* (Kabara JJ ed) Am Oil Chem Soc. Champaign, IL
34. Baker, H.G., Baker, I., 1973b. Amino acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241, 543–545
35. Barbier, M., 1971. Chemistry and biochemistry of pollens. *Progress Phytochem.* 2, 1–34

36. Le comportement alimentaire de l'abeille domestique vis-à-vis des glucides. A. POUVREAU et R. MARILLEAU Laboratoire de Neurobiologie Comparée des Invertébrés. INRA, C.N.R.S.,91440 Bures-sur-Yvette
37. Le nourrissage des abeilles - François Jeanne OPIDA
38. Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) Pedro Guilherme FERNANDES-DA-SILVAa, José Eduardo SERRÃO Apidologie 31 (2000) 39–45
39. Effect of dietary vitamin C levels on the rate of brood production of free-flying and confined colonies of honey bees.E.W. HERBERT Jr. *, J.T. VANDERSLICE ** and D.J. HIGGS, 1986
40. Inspection and Feeding of Larvae by Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae): Effect of Starvation and Food Quantity –Zhi Jong Huang, G. Otis, Journal of Insect Behavior,vol.4, no.3. 1991