UNIVERSITE DE MONS-HAINAUT

FACULTE DES SCIENCES

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Préférence des reines vierges de *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) envers les sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de divers âges et sous-espèces

Directeur de mémoire
Prof. Pierre Rasmont

Mémoire de fin d'études
présenté par **Tifany Mathy**
en vue de l'obtention du diplôme de
Licenciée en Sciences Biologiques

Année académique 2006-2007

Mathy T. 2007. *Préférence des reines vierges de* Bombus terrestris *(L.) envers les sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de divers âges et sous-espèces (Hymenoptera, Apidae).* Mémoire de Licence en Sciences biologiques, Université de Mons-Hainaut, Mons, 70 p.

Résumé: Chez les bourdons, les sécrétions labiales céphaliques des mâles comportent des phéromones sexuelles qui attirent les femelles conspécifiques. Il existe une variabilité dans la composition de ces sécrétions céphaliques en fonction de l'âge et de la distance géographique des différentes sous-espèces de *Bombus* (*Bombus) terrestris* (L.).

Le premier but de la présente étude est de vérifier si les reines vierges de *B. terrestris* marquent une préférence envers les sécrétions des mâles de certains âges. Pour ce faire, des reines de *B. terrestris dalmatinus* sont placées dans un olfactomètre et mises en présence des sécrétions céphaliques des mâles d'âges différents: 1 jour, 3 jours, 7 jours, 10 jours, 15 jours et 30 jours. Les résultats montrent que les reines vierges de *B. terrestris dalmatinus* se dirigent de préférence vers les sécrétions céphaliques des mâles âgés de 10 jours.

Le second but de l'étude est de vérifier si les reines vierges de *B. terrestris* marquent une préférence envers les sécrétions des mâles de leur propre sous-espèce. Pour ce faire, des reines de *B. terrestris dalmatinus* et de *B. terrestris xanthopus* sont placées dans un olfactomètre et mises en présence des sécrétions céphaliques des mâles de 6 sous-espèces: *terrestris*, *lusitanicus*, *dalmatinus, xanthopus, sassaricus* et *canariensis.* Des mâles de *Bombus* (*Bombus) ignitus* Smith servent de témoin non conspécifique. Les résultats montrent que les reines vierges de *B. terrestris dalmatinus* et de *B. terrestris xanthopus* se dirigent de préférence vers les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce.

Mots clés: *Bombus terrestris*, phéromones, comportement précopulatoire, olfactomètre

Remerciements

Je tiens à remercier par ces quelques lignes toutes les personnes qui ont contribué de près comme de loin à l'élaboration du présent travail.

Je remercie le Prof. Pierre Rasmont de m'avoir accueillie dans son service, pour ses conseils judicieux et son attention.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Marie-Claire Cammaerts - Tricot pour son extrême gentillesse, ses innombrables conseils, son attention et son soutien constant.

Je remercie le Dr. Michaël Terzo et Mlle Audrey Coppée pour leurs conseils avisés et leur disponibilité.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Mme Stéphanie Iserbyt pour tout le temps qu'elle m'a consacré, son aide précieuse dans les méandres des statistiques et son soutien constant.

Je remercie la Firme Biobest et plus particulièrement MM. R. De Jonghe et J. Vermeulen ainsi que le laboratoire du Prof. L. Chittka (Queen Mary University of London, Londres) de m'avoir fourni les nombreuses reines de bourdons nécessaires au présent travail.

Je remercie M. Francis Delmarquette pour la construction de l'arène expérimentale et ses nombreuses interventions techniques.

Je tiens également à remercier Mlle Mélanie Gorez et M. Adrien Chorein pour m'avoir aidée à maintenir en vie nos chers et tendres bourdons.

Je n'oublie pas mes proches (mes parents, ma famille, Pierre, Maïté, Céline) qui m'ont été indispensables dans les moments les plus difficiles.

Que toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et que je n'ai pas citées ici sachent que je ne les oublie pas et que je les remercie.

Table des matières

1. Introduction **1**
1.1. Modèle biologique 1
1.2. La notion d'espèce 3
1.3. La communication 3
1.4. Phéromones 4
1.5. Mécanismes d'orientation 4
1.6. Le SMRS des bourdons 5
1.7. Sécrétion des glandes labiales céphaliques 7
1.8. Variation des sécrétions des glandes labiales céphaliques 8
1.8.1. Variabilité interspécifique 8
1.8.2. Variabilité intraspécifique 9
1.8.3. Variabilité temporelle 10
1.9. Le 2,3-dihydro-6-trans farnesol est-il le constituant attractif? 11
1.10. Objectifs 12
2. Matériel et méthode **13**
2.1. Principe du test 13
2.2. Construction du dispositif et de la caméra 13
2.3 Matériel biologique 15
2.3.1. Maintenance des reines 15
2.3.2 Identification de chaque reine 16
2.3.3. Extraction des glandes labiales céphaliques 16
2.4. Protocole expérimental 17
2.5. Contrôle 18
2.6. Nettoyage 18
2.7. Analyses statistiques 18
2.8 Modifications apportées 19
2.9. Analyses statistiques du nouveau jeu de données 21
2.10. Vérification de la caste et de la virginité 22
3. Résultats **23**
3.1. Olfactométrie en fonction de l'âge 23
3.1.1. Contrôle 23
3.1.2. Temps passé dans chaque zone pour les reines de *Bombus terrestris dalmatinus* 23
3.2. Olfactométrie en fonction des sous-espèces 25
3.2.1. Première série 25
3.2.1.1. Contrôle 25
3.2.1.2. Nombre d'observations dans chaque zone pour les reines de *Bombus terrestris dalmatinus* 25
3.2.2. Seconde série 27
3.2.2.1. Reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* 27
3.2.2.2. Reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* 39
3.3. Résultats des dissections 50
3.4. Commentaire des résultats 51
3.4.1. Influence de l'âge 51
3.4.2. Influence des différentes sous-espèces 51
3.4.2.1. Première série 51
3.4.2.2. Deuxième série 51
3.4.2.3 Comparaison des résultats des deux séries 54
4. Discussion **55**
4.1. Olfactométrie en fonction de l'âge 55
4.2. Olfactométrie en fonction des sous-espèces 55
5. Conclusion **64**
5.1 Préférence des femelles envers les mâles de différents âges 64
5.2 Préférence des femelles envers les mâles de différentes sous-espèces 64
6. Perspectives **65**
7. Références **66**

1. Introduction

Bombus terrestris (L.) est une espèce de bourdon qui présente un interêt économique non négligeable. Il est relativement facile à élever, les colonies produisent un grand nombre de sexués et s'adaptent facilement aux conditions artificielles. De plus, depuis 1980 (Ings *et al*., 2005; Velthuis & van Doorn, 2006), il est reconnu comme excellent pollinisateur. Pollinisateur précoce à longue période d'activité, à poils denses, capable de s'adapter à une grande variabilité de températures et de climats, il convient bien pour la culture en serre, notamment pour celle de la tomate (Shao *et al.,* 2004; Inari *et al*., 2005, Winter *et al*. 2006). L'exportation de plus en plus massive de *Bombus terrestris* effraie les écologistes qui s'interrogent sur le bien fondé d'introduire des espèces exotiques (Inari *et al*., 2005; Ings *et al*., 2005). Si des *Bombus terrestris*, issus de l'exportation, s'échappent des serres quelles seront les conséquences pour les espèces indigènes? Des accouplements avec les espèces indigènes sont-ils possibles? Si cela devait être le cas, la diversité génétique normale de *B. terrestris* serait-elle menacée? (Widmer *et al*., 1998; Ings *et al*., 2005) Une extinction des bourdons locaux par supplantation ou l'apparition d'hybrides par brassage de gènes est-elle à envisager, voire à craindre? (Goka *et al.,* 1998)

Bombus terrestris présente un grand nombre de taxons dont le statut subspécifique est toujours mis en doute: Rasmont (1982) dit que "*Chez les sous-espèces insulaires, la coloration est totalement différente de celle des sous-espèces continentales taxonomiquement proches. Certains caractères morphologiques divergent suffisamment pour qu'on puisse émettre l'hypothèse qu'elles ont atteint le statut de bonne espèce*". D'après Terzo *et al.* (2003), la composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques fournit des caractères supplémentaires pour la classification phylogénétique. L'analyse des sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. terrestris* ainsi que les observations comportementales des reines vierges en présence des sécrétions de glandes labiales céphaliques de mâles de différents taxons devrait apporter de plus amples informations.

1.1. Modèle biologique

B. terrestris (L.) est une espèce eusociale primitive à large distribution géographique centrée sur la Méditerranée (Rasmont, 1983, Rasmont & Terzo, in prep.; fig.1) et qui s'étend jusqu'à la latitude de Stockolm au nord et jusqu'à l'Altaï à l'est.

Cette espèce compte 9 sous-espèces (Rasmont, 1983):

- *africanus* Krüger 1956 en Afrique du Nord;
- *audax* Harris 1780 dans les îles Britanniques;
- *calabricus* Krüger 1958 dans le sud de l'Italie, la Calabre et la Sicile;
- *canariensis* Pérez 1895, seule espèce de bourdon de l'archipel des Canaries.
- *dalmatinus* Dalla Torre 1882, de l'extrême sud-est de la France jusqu'au nord de la péninsule italique, les Balkans, la Turquie, le sud de la Russie et l'Altaï;
- *lusitanicus* Krüger 1956 dans le sud-ouest de la France, la péninsule ibérique, les Baléares et Madère;
- *sassaricus* Tournier 1890 endémique de Sardaigne;
- *terrestris* L. 1758, présent dans toute l'Europe continentale au nord du 45ème parallèle jusqu'au sud de la Fennoscandinavie;
- *xanthopus* Kriechbaumer 1870 en Corse, sur l'île de Capraia et sur l'île d'Elbe.

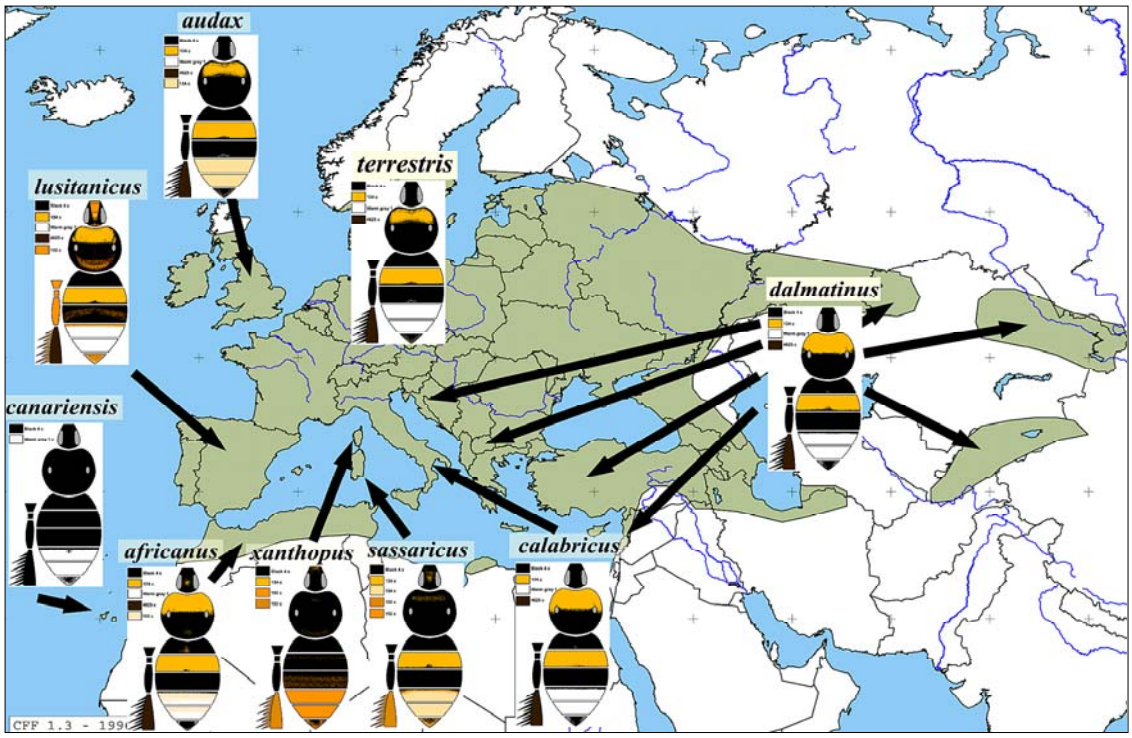

Figure 1. Distribution géographique des sous-espèces de *Bombus terrestris* (L.) (d'après Rasmont com. pers.).

D'après les études génétiques d'Estoup *et al.* (1996), de Widmer *et al.* (1998) et Shao *et al.*, 2004, il existe une relative homogénéité génétique au niveau des différentes populations continentales de *B. terrestris.* Cependant, ils observent une différence marquée entre les populations insulaires (*B. t. sassaricus*, *B. t. canariensis* et *B. t. audax*) et continentales. La coloration des *B.terrestris* est très peu variable sur le continent alors qu'en Corse la coloration de *B. terrestris* est extrêmement différente de celle des populations continentales. Rasmont (1982) dit que "*Les grosses différences entre les populations insulaires et continentales suggèrent fortement une immigration très ancienne*"

1.2. La notion d'espèce

Il existe plusieurs définitions de l'espèce. Mayr (1963) la définit comme l'ensemble des individus potentiellement capables de produire une descendance fertile. Une espèce inclut alors tous les individus qui pourraient s'accoupler et être interfertiles.

Selon Paterson (1993), une espèce regroupe l'ensemble des individus capables de se reconnaître eux-mêmes comme conjoints potentiels. Un individu doit être apte à chercher, trouver un conjoint et l'identifier comme tel. Une espèce ne se définirait donc plus par son interfertilité mais par son "SMRS" ("*Species Mate Recognition System"*).

Chez les bourdons, trouver un conjoint n'est possible que si la distribution géographique, les périodes d'émergence des sexués, les périodes de maturité sexuelle et la morphologie des genitalia sont compatibles (Svensson, 1979). Néanmoins, c'est le SMRS, sous la forme de phéromones sexuelles, qui détermine la rencontre et la reconnaissance des conjoints. Chez ces insectes, ce sont les mâles qui produisent les phéromones sexuelles spécifiques et qui attirent les femelles.

1.3. La communication

Une reproduction sexuée avec fécondation interne impose une communication intraspécifique, c'est-à-dire entre individus de même espèce. Mâle et femelle doivent se retrouver. Une communication à distance doit permettre d'attirer le bon conjoint (Leroy, 1987).

La communication animale fonctionne par intermittence. Les appels sexuels, entre autre, ne sont émis que pendant la période de la reproduction. Des facteurs externes et internes influencent donc ces émissions. Le photopériodisme, c'est-à-dire le rapport entre les temps de lumière et d'obscurité, contrôle l'activité reproductrice saisonnière (Leroy, 1987). La satiété ou l'appétence influence le comportement d'attirance. Dans bien des cas, une femelle fécondée reste insensible aux appels sexuels du mâle (Free, 1970; Leroy, 1987; Sinkevich, 2006).

Ainsi, ni l'émission des signaux, ni la réaction à ceux-ci ne se font constamment (Leroy, 1987).

Certaines espèces sont dites "spécialistes" parce qu'elles ne perçoivent que la phéromone sexuelle conspécifique. En revanche, d'autres sont appelées "généralistes" car elles sont sensibles à un large éventail de substances (Leroy, 1987).

Grâce à ses antennes, un bourdon est capable de détecter des molécules odorantes. Leurs antennes portent des milliers de micro-sensilles olfactives. Chaque sensille est stimulée par des molécules particulières (Masson & Strambi, 1977 cité par Passera & Aron, 2005).

1.4. Phéromones

Karlson & Butenandt (1959) définissent les phéromones comme étant des substances sécrétées à l'extérieur par un individu, perçues par un autre individu de la même espèce et qui provoquent chez celui-ci une modification soit comportementale soit physiologique.

A la différence des hormones, les phéromones ne sont pas véhiculées par le sang mais par des individus dans un groupe social. Ce sont donc des substances messagères chimiques qui permettent une communication entre individus.

Karlson (1960) distingue deux types de phéromones: celles qui sont actives dès leur olfaction et celles qui agissent après ingestion. Le premier groupe reprend, entre autres, les substances attractives sexuelles, celles de marquages territoriaux, les substances d'alarmes et de pistes. Le deuxième groupe, comporte, entre autre, les substances inhibitrices de la production sexuée (identifiées chez l'abeille domestique et les termites). Wilson (1963, cité par Pain, 1971), Regnier & Law (1968) différencient les phéromones de déclenchement (*"releaser pheromone"*) qui agissent sur le comportement par l'intermédiaire du système nerveux et les phéromones d'amorçage (*"primer pheromone"*) qui modifient la physiologie, notamment celle du système reproducteur et endocrinien.

Dans le présent travail, on s'intéressera aux phéromones qui agissent par olfaction et plus précisément, celles qui régissent le comportement d'attraction sexuelle et qui constituent le SMRS de *B. terrestris* (L.).

1.5. Mécanismes d'orientation

Une substance odorante libère des molécules dans l'air. La température de l'air influence cette volatilisation. A partir d'environ 20°C, les molécules de l'air sont agitées et optimisent la diffusion et le transport des molécules odorantes jusqu'aux organes olfactifs des animaux (Leroy, 1987).

Un animal peut atteindre un lieu précis (une source qui émet une odeur par exemple) de 4 manières différentes (Fraenkel & Gunn, 1940):

- par hasard,
- en s'orientant vers cette source (en y étant attiré; c'est la **taxie positive**),
- en se déplaçant moins vite au voisinage de la source (**orthokinésie négative**, entraînant parfois l'arrêt),
- en se déplaçant de manière plus sinueuse au voisinage de la source (**klinokinésie positive**).

Comment une odeur (c'est-à-dire des molécules diffusées) intervient-elle pour diriger l'insecte vers la source émettrice? Des expériences faites sur le papillon *Pectinophora gossypielle* (Saunders) montrent que l'insecte, dans un air immobile, est capable de trouver la source odorante en se déplaçant en zig-zag, à partir d'une distance de deux mètres (Farkas & Shorey, 1972).

Il tente de progresser à contre-courant par rapport au gradient de concentration. S'il ne perçoit plus les molécules chimiques, il fait demi-tour ou s'arrête et ne redémarre qu'après perception de la stimulation chimique spécifique. C'est l'anémotaxie (Leroy, 1987).

Plus l'insecte s'approche de la source émettrice, plus la concentration en substance est grande. Un nombre de plus en plus grand de molécules atteignent les récepteurs antennaires ce qui permet à l'animal de s'orienter. D'après Von Békésy (1964, cité par Leroy, 1987), pour qu'il y ait orientation vers la source émettrice, il doit y avoir un décalage perceptif entre le côté droit et gauche de l'animal. C'est en appréciant ces décalages et en tentant de les égaliser que l'animal progresse vers la source émettrice (Leroy, 1987).

1.6. Le SMRS des bourdons

Chez la plupart des espèces, les mâles réalisent un circuit le long duquel ils déposent des sécrétions phéromonales (fig.2). Une fois les marquages odorants terminés, le mâle patrouille régulièrement la zone marquée, à la recherche d'une femelle pour s'accoupler (Svensson, 1979). Chez certaines autres espèces de bourdons, les mâles se postent à l'affût sur un perchoir, autour duquel ils réalisent des marquages phéromonaux, et attendent le passage d'une femelle. Chez d'autres espèces, les mâles restent aux alentours des nids et surveillent la sortie éventuelle d'une jeune reine.

Le marquage consiste à mordiller différents supports (feuilles, tiges, troncs, …) pour y déposer les sécrétions phéromonales (Haas, 1949) qui s'écoulent par la base de la langue (fig.3). La nature des supports marqués et le type de circuits peuvent varier d'une espèce à l'autre (Haas, 1949; Svensson, 1979). Svensson (1979) a observé qu'il est plus efficace pour les mâles de réaliser des circuits de patrouille communs plutôt que d'établir chacun un circuit dans une zone isolée. Grâce aux marquages d'autres individus, un mâle peut se permettre de dépenser moins d'énergie dans le marquage sans pour autant diminuer son attractivité envers les femelles. Néanmoins, bien que les circuits soient interconnectés, ils demeurent partiellement individuels.

Selon Bergman (1997), les composés chimiques qui constituent les phéromones attirent les reines à distance. D'après les expériences éthologiques menées par Sinkevich (2006), seules les reines vierges sont attirées par les sécrétions phéromonales; sur des reines fécondées, l'effet est nul ou répulsif.

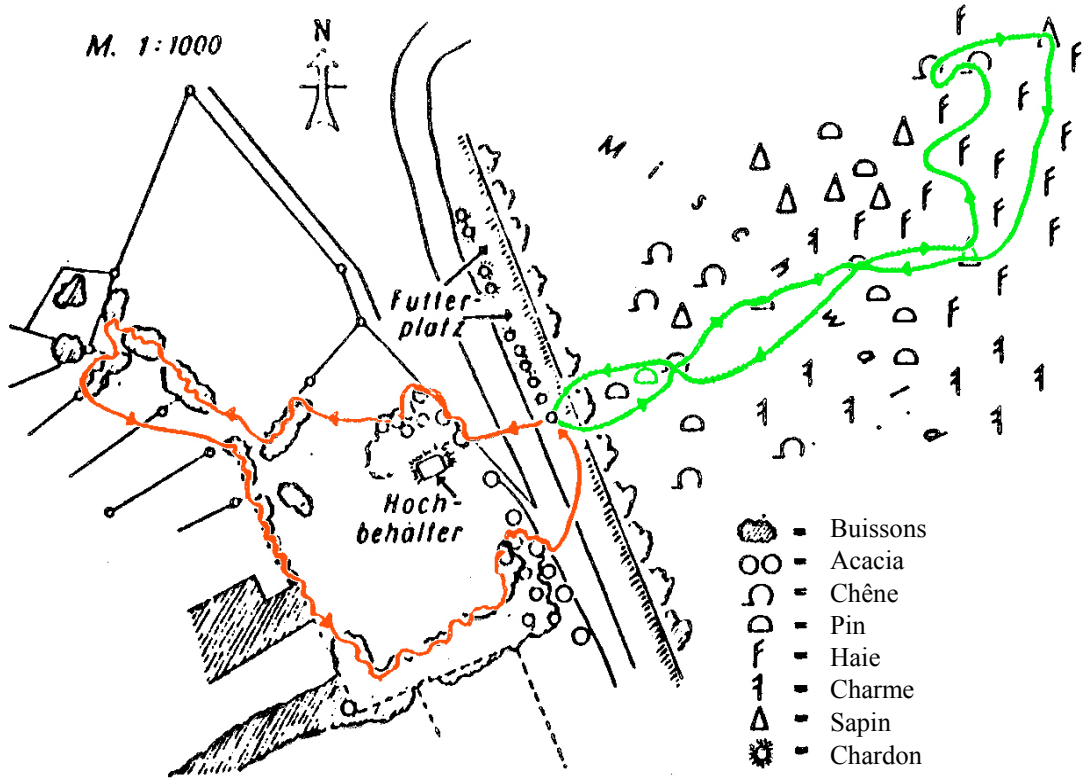

Figure 2. Circuit de patrouille de *Bombus terrestris*. (à gauche) et de *Bombus cryptarum* (à droite) (d'après Haas, 1967).

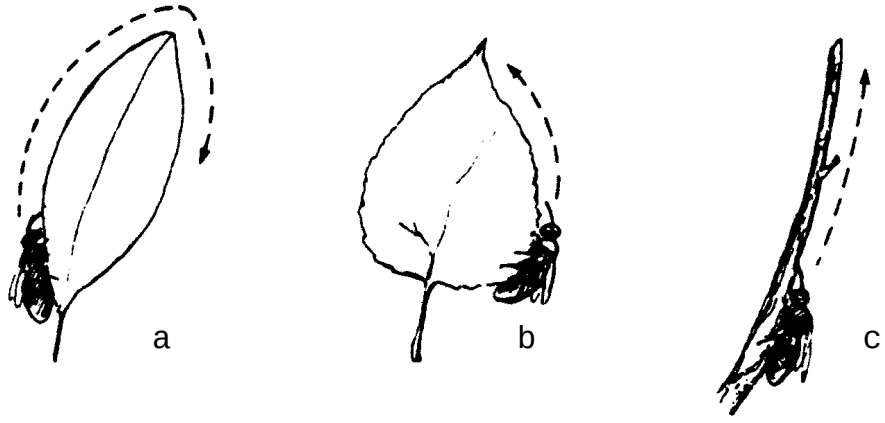

Figure 3. Comportement de marquage d'un mâle de *Bombus lapponicus* (Fabricus): (a) sur une feuille de *Salix glauca L.*, (b) sur une feuille de *Betula tortuosa* L., (c) sur une branche sèche de *Betula nana* L. (d'après Svensson, 1979).

1.7. Sécrétion des glandes labiales céphaliques

Les mâles de bourdons émettent un bouquet phéromonal spécifique pour attirer les femelles vierges. Ce bouquet est un ensemble de substances sécrétées par les glandes labiales céphaliques (fig.4). Ces glandes acineuses paires occupent la majeure partie du volume de la tête. Leurs sécrétions se déversent dans une bourse où se rejoignent également les canaux excréteurs des glandes labiales thoraciques et des glandes salivaires. Le conduit de cette bourse aboutit à la base de la langue.

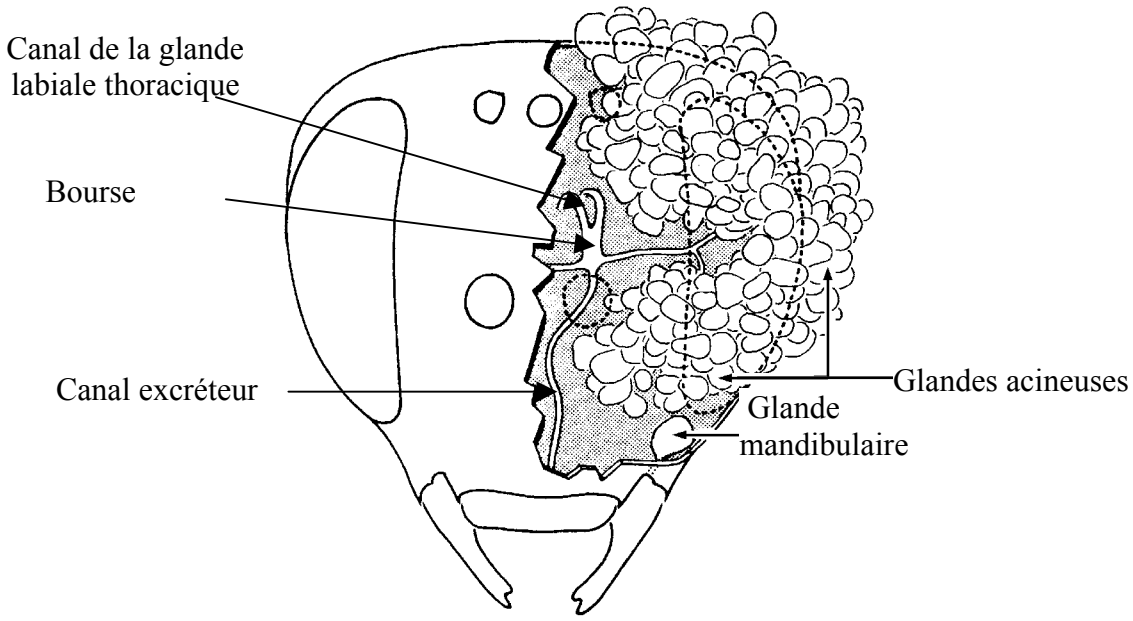

Figure 4. Dessin semi-diagrammatique de la vue frontale de la tête d'un mâle de *Bombus lapidarius* (L.) (d'après Ågren *et al*., 1979).

Les phéromones sexuelles sont des isoprénoïdes (terpénoïdes) et des dérivés d'acides gras (fig.5). Les isoprénoïdes dérivent du métabolisme de l'acide mévalogénique.

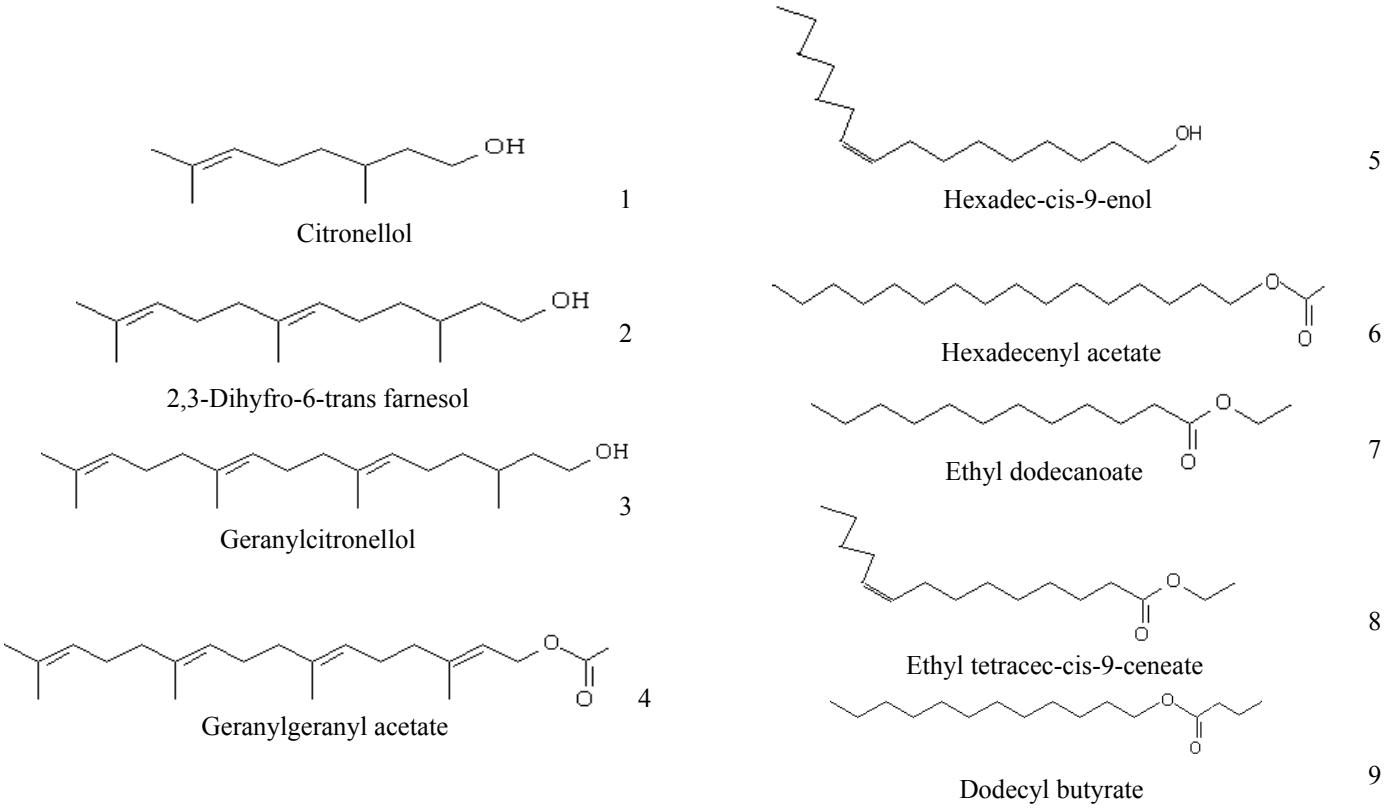

Figure 5. Exemples de molécules émises par les glandes labiales céphaliques. 1-4: terpénoïdes; 5-9: dérivés d'acides gras (d'après Bergström *et al.* 1981).

1.8. Variation des sécrétions des glandes labiales céphaliques

1.8.1. Variabilité interspécifique

Bien que la part phéromonale des sécrétions des glandes labiales céphaliques ne soit pas encore connue, on sait que chaque espèce de bourdon possède son propre bouquet phéromonal. A titre d'exemple, la figure 6 présente les chromatogrammes des sécrétions céphaliques de quatre espèces du sous-genre *Bombus* présentes en Belgique.

D'après Coppée (2006), certaines sous-espèces de *B. terrestris* (*lusitanicus, terrestris, sassaricus, dalmatinus*) ont des sécrétions suffisamment différentes pour être significativement distinctes. Cela est probablement dû à leur isolement géographique. Coppée émet l'hypothèse qu'il puisse y avoir un isolement dû à la distance comme cela existe dans les Artenkreis (cas célèbre du Goéland argenté). Chaque population est capable de s'hybrider avec celles qui la jouxtent, mais pas avec les populations plus éloignées. Ce phénomène peut s'expliquer par de petites variations interpopulationnelles de SMRS qui ne permettent plus la reconnaissance spécifique entre individus de populations éloignées (Rensch, 1933 et Stresemann & Timofeeff-Ressovsky, 1947).

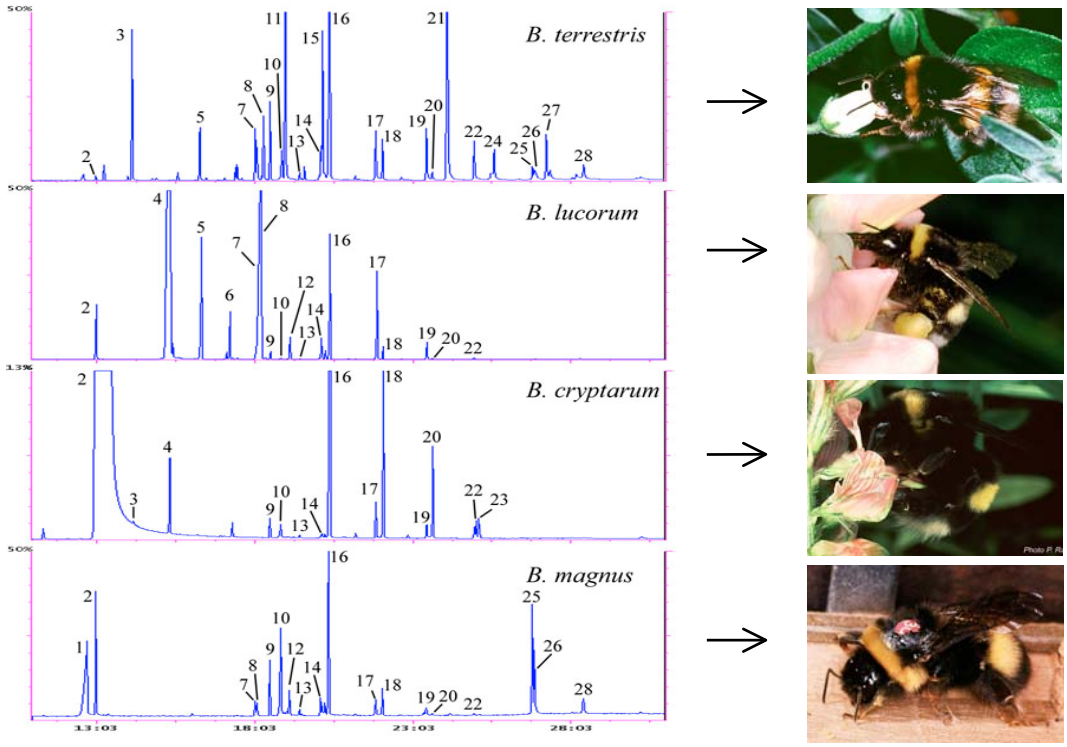

Figure 6. Chromatogrammes de quatre espèces proches de bourdons: *Bombus terrestris, B. lucorum, B. cryptarum, B. magnus* (d'après Terzo, com. pers).

1.8.2. Variabilité intraspécifique

La composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques varie non seulement avec les saisons (Kullenberg *et al.*, 1973) mais aussi en fonction du spécimen (Terzo *et al.*, 2005). Ce dernier point a pu être observé sur *B. ruderarius* (Müller) et *B. sylvarum* (L.). Chose curieuse, même la molécule principale du bouquet peut disparaître (fig.7).

Coppée (2005) a pu mettre en évidence que l'âge avancé des mâles de bourdons peut expliquer la disparition de leur composé majeur.

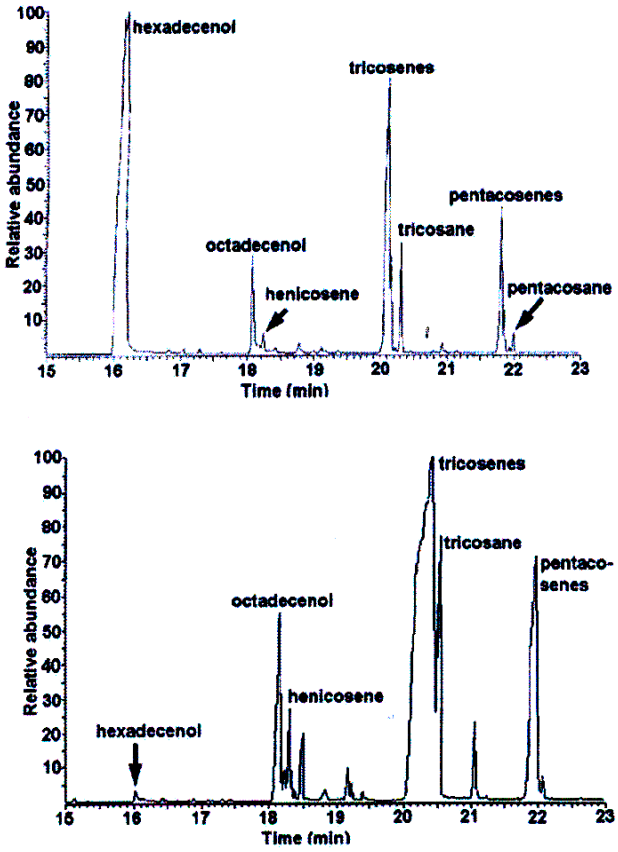

Figure 7. Chromatogrammes des sécrétions de deux spécimens de *Bombus ruderarius* (Müller) (d'après Terzo *et al.*, 2005).

1.8.3. Variabilité temporelle

Les premiers jours qui suivent leur émergence, les jeunes mâles de bourdons ne quittent pas le nid. Ils sont d'ailleurs inaptes à voler et les sécrétions de leurs glandes labiales céphaliques sont extrêmement réduites. Ils y restent généralement entre 2 et 7 jours, en fonction des conditions climatiques. Ce laps de temps leur permet d'achever leur développement morphologique et physiologique de sorte que leur production phéromonale soit optimale dès la sortie du nid (Ågren *et al.*, 1979).

D'après l'étude de Coppée (2005) sur *B. t. terrestris* (L.), l'abondance relative de certains composés des sécrétions des glandes labiales céphaliques varie fortement avec l'âge. Une augmentation quantitative de la plupart des composés débute vers 1 ou 2 jours et s'achève à partir de 20 jours.

Le 2,3-dihydro-6-trans farnesol (DHF), composé principal chez *B. t. terrestris*, joue probablement un rôle dans la reconnaissance spécifique. Ce composé est présent en faible quantité chez les jeunes spécimens ainsi que chez les spécimens âgés, alors qu'il est très abondant (jusqu'à 60% de l'abondance relative des sécrétions pour plus de 50 composés identifiés) chez les spécimens d'âge moyen.

La composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques varie donc avec l'âge des spécimens. Sur base de cette variation, il est possible de séparer les mâles en 4 classes d'âges (Coppée, 2005):

1: 0 jour;

2: de 1 à 5 jours (période de vie intranidale);

3: de 5 à 25 jours (maturité sexuelle);

4: de 25 à 40 jours (dégénérescence des glandes labiales céphaliques).

1.9. Le 2,3-dihydro-6-trans farnesol est-il le constituant attractif?

D'après Sinkevich (2006), l'attractivité des mâles de *B. terrestris* envers leurs femelles ne peut être attribuée au seul composé principal, le 2,3-dihydro-6-trans farnesol. Cette molécule est présentée en figure 8.

Figure 8. Structure moléculaire du 2,3-dihydro-6-trans farnesol.

Dans cette étude, des reines vierges de *B. terrestris* sont confrontées à des sécrétions labiales de mâles de quatre espèces de bourdons, *B. terrestris* (L. 1758), *B. cingulatus* (Wahlberg 1854), *B. jonellus* (Kirby 1802) et *B. lucorum* (L. 1761). Les trois premières espèces ont une grande quantité de 2,3-dihydro-6-trans farnesol dans leurs sécrétions. *B. lucorum* ne possède pas de 2,3-dihydro-6-trans farnesol et sert de témoin. Le dispositif expérimental utilisé est une boîte en plexiglas de 20 cm de coté sur 5 cm de hauteur. Le couvercle est muni d'un trou qui permet l'insertion de la reine de bourdon tandis que le fond de l'arène est recouvert de papier filtre remplacé après chaque expérience. Sur le fond de la boîte, quatre zones identiques sont délimitées. Sur chacune d'elles est déposé aléatoirement: 2,5 µl de l'extrait spécifique, 2,5 µl d'un des extraits non spécifiques, 2,5 µl d'hexane tandis qu'une des zones reste vide (témoin).

L'expérience se réalise en lumière rouge. Les bourdons ne voient pas cette gamme de longueur d'onde et ne sont influencés que par les signaux olfactifs. Le comportement de la reine est filmé à l'aide d'une caméra vidéo au dessus de l'arène expérimentale.

La position de la reine est relevée toutes les 5 secondes, durant 6 minutes. L'analyse des 73 positions relevées permet de déterminer la zone la plus souvent visitée, et d'en déduire l'odeur la plus attractive.

Les résultats montrent que les reines vierges de *B. terrestris* sont capables de reconnaître les extraits conspécifiques (de la même espèce) (fig.9), même si le composé majeur des autres extraits est également le 2,3-dihydro-6-trans farnesol. Le 2,3-dihydro-6-trans farnesol (DHF) n'est donc pas le seul composé phéromonal actif parmi l'ensemble des molécules des sécrétions labiales. A courte distance, il n'est évidemment pas le seul élément attractif. Toutefois, en raison de sa concentration élevée et de sa forte volatilité (poids moléculaire faible), il paraît être un composé attractif important à longue distance (Sinkevich, 2006).

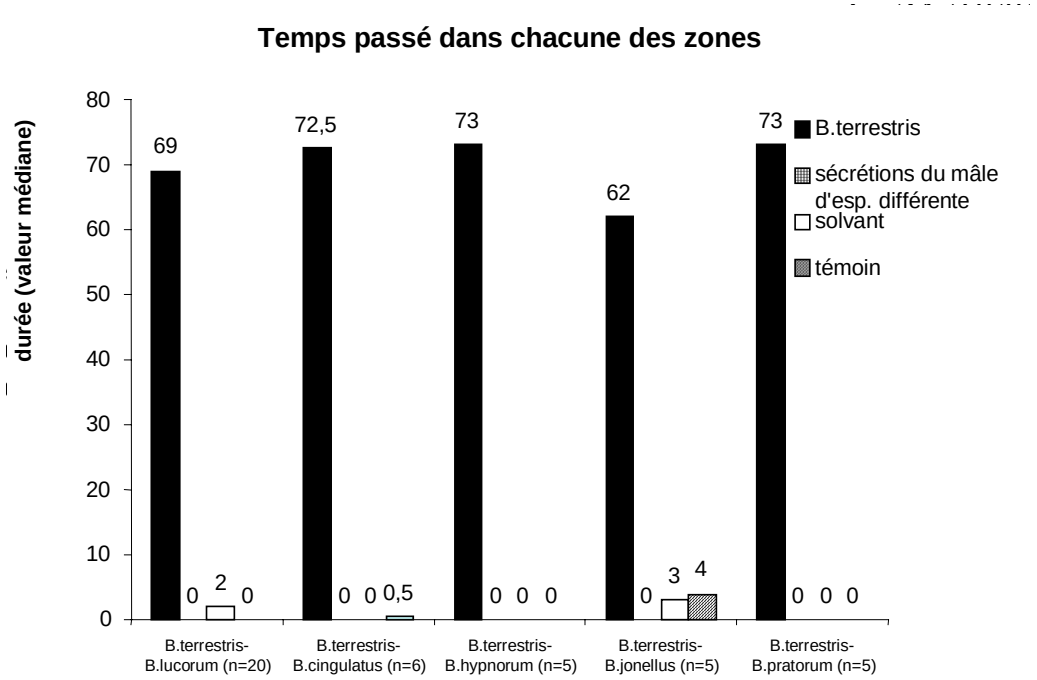

Figure 9. Olfactométrie des reines vierges de *Bombus terrestris* confrontées à des bouquets phéromonaux conspécifiques et de cinq autres espèces. *B. lucorum* ne présente pas de DHF, molécule principale de la sécrétion de *B. terrestris, B. cingulatus*, *B. hypnorum*, *B. jonellus* et *B. pratorum* comprennent du DHF parmi les molécules principales de leur bouquet phéromonal (d'après Sinkevich, 2006).

1.10. Objectifs

Les femelles vierges montrent-elles une préférence envers les mâles d'un certain âge? L'hypothèse de travail est que la préférence des reines pour les mâles de différents âges ne varie pas.

Les femelles vierges marquent-elles une préférence envers les mâles de leur propre sous-espèce? En d'autres termes, les femelles préfèrent-elles ou non des mâles consubspécifiques (de la même sous-espèce)? L'hypothèse de travail est que les reines ne préfèrent pas les mâles de l'une ou l'autre sous-espèce.

2. Matériel et méthode

2.1. Principe du test

Le test d'olfactométrie s'inspire du dispositif expérimental utilisé par Sinkevich (2006). Pour rappel, celui-ci est constitué d'une boîte en plexiglas de 20 cm de côté sur 5 cm de hauteur. Plusieurs problèmes se posent:

- le plexiglas utilisé risque de retenir certains résidus pouvant engendrer des phénomènes d'attraction ou de répulsion indésirables,
- l'aire de déplacement des reines étant réduite, celles-ci réagissent trop rapidement aux extraits et s'y arrêtent après seulement quelques secondes,
- l'atmosphère de la zone de test peut être rapidement saturée par les molécules volatiles.

Ce dispositif expérimental est donc modifié de la façon suivante. Le plexiglas est remplacé par du verre et les dimensions de l'arène sont augmentées. Un treillis est disposé en cercle pour empêcher la reine d'entrer en contact avec les sources d'odeur placées aux quatre angles de l'arène expérimentale et de s'y arrêter.

2.2. Construction du dispositif et de la caméra

L'arène expérimentale est constituée d'un socle carré en verre de 70 cm de côté. Ce support est délimité par un bord en verre de faible hauteur (8 cm), ce qui empêche le vol de la reine étudiée (fig. 10 et 11). L'utilisation du verre évite toute adsorption de molécules organiques. L'olfactomètre est recouvert par une plaque de polycarbonate munie d'un trou central. Dans ce cas, l'utilisation du verre n'est pas possible pour des raisons d'encombrement et de poids.

Le trou, pratiqué au centre de la plaque de polycarbonate, permet l'introduction d'une boîte de Pétri suspendue à un fil. Ce récipient accueille la reine le temps qu'elle se calme.

L'arène expérimentale est divisée en quatre zones identiques de 35 cm de côté. A l'intérieur, un treillis plastifié (grille soudée "quadro plast") de 8 cm de haut, disposé en cercle, empêche l'animal d'approcher les sources d'odeur placées aux quatre angles de l'olfactomètre (fig. 10 et 11).

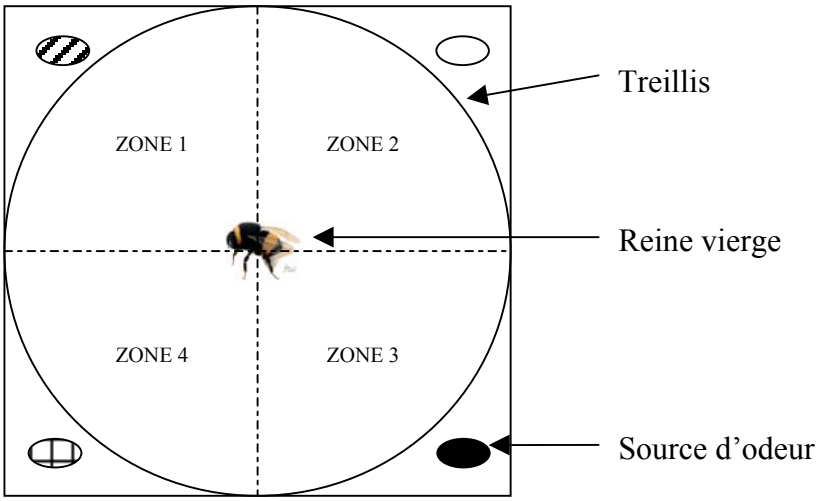

Figure 10. Arène expérimentale utilisée lors des expériences.

Une webcam (Philips SPC 900NC PC Camera) (fig.12), reliée à un ordinateur, est placée juste au dessus de l'olfactomètre. L'enregistrement permet de revoir le trajet parcouru par l'animal et de retracer la succession des zones visitées.

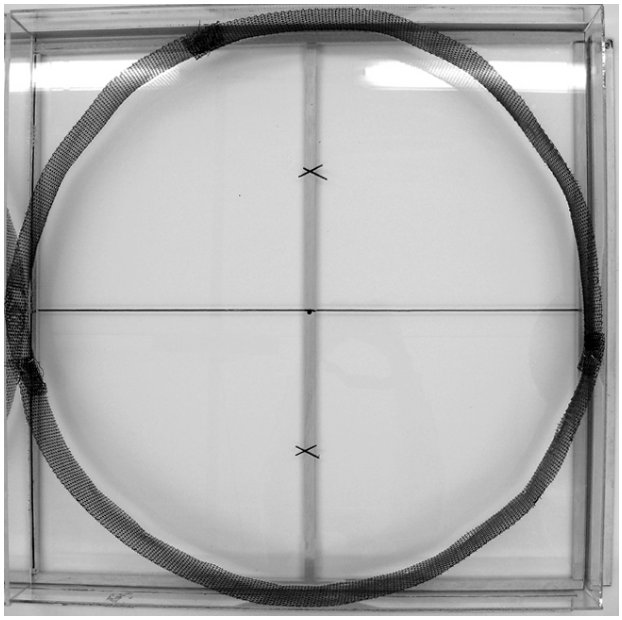

Figure 11. Olfactomètre utilisé pour les expériences.

Figure 12. Webcam utilisée pour les expériences.

2.3 Matériel biologique

Quarante reines vierges de *B. t. dalmatinus* Dalla Torre ont été fournies par la société Biobest bvba (Westerlo, Belgique). *B. terrestris* (L.) a été choisi pour sa facilité d'élevage et sa disponibilité commerciale.

Les sécrétions de mâles âgés de 1 à 30 jours ont été utilisées pour étudier la variabilité en fonction de l'âge, de l'attractivité des sécrétions des glandes labiales céphaliques de mâles de *B. t. dalmatinus.*

Sur des reines vierges de *B. t. dalmatinus*, les sécrétions de mâles d'âges suivants: 1 et 7 jours, 3 et 7 jours, 7 et 10 jours, 7 et 15 jours, 7 et 30 jours, choisis en se référant aux classes d'âge établies par Coppée (2005), ont été testées.

Les combinaisons utilisées pour étudier l'attractivité des sécrétions des glandes labiales céphaliques de mâles de différentes sous-espèces envers les reines vierges de *B. t. dalmatinus* furent: *B. t. dalmatinus* et *B. t. canariensis*, *B. t. dalmatinus* et *B. t. lusitanicus, B. t. dalmatinus* et *B. t. sassaricus, B. t. dalmatinus* et *B. t. terrestris.*

2.3.1. Maintenance des reines

Les reines sont logées par trois dans des cages en bois de pin non traité et pourvues d'un couvercle en plexiglas (fig.13 et 14). Elles sont nourries *ad libitum* de pollen et de nectar, renouvelés tous les deux jours. La température de la pièce est comprise entre 20°C et 30°C, l'humidité relative oscille entre 45% et 55% Ces paramètres optimaux ont été déterminés par Djegham (1991). Elle observe un plus grand nombre d'accouplements à une température comprise entre 20 et 25°C et à une humidité relative comprise entre 60% et 70%. Cependant, lors des expériences, les reines testées ne se déplaçaient pas, elles semblaient endormies. Il a donc été décidé de diminuer l'humidité relative tout en maintenant une température proche de 25°C.

Figure 13. Cages des reines.

Figure 14. Détail des cages des reines.

2.3.2 Identification de chaque reine

Chaque individu est marqué à l'aide d'une étiquette numérotée, collée sur son thorax (fig.15). Cette identification permet de ne pas répéter la même expérience sur la même reine et d'éviter ainsi toute habituation.

Figure 15. Reine de *Bombus terrestris dalmatinus* marquée.

2.3.3. Extraction des glandes labiales céphaliques

Les glandes labiales céphaliques volumineuses, situées derrière les yeux (fig.16), sont isolées et placées dans un flacon avec 200 µl d'hexane (fig.17). Elles sont maintenues 24h à température ambiante, puis conservées à -30°C (Terzo *et al.*, 2005).

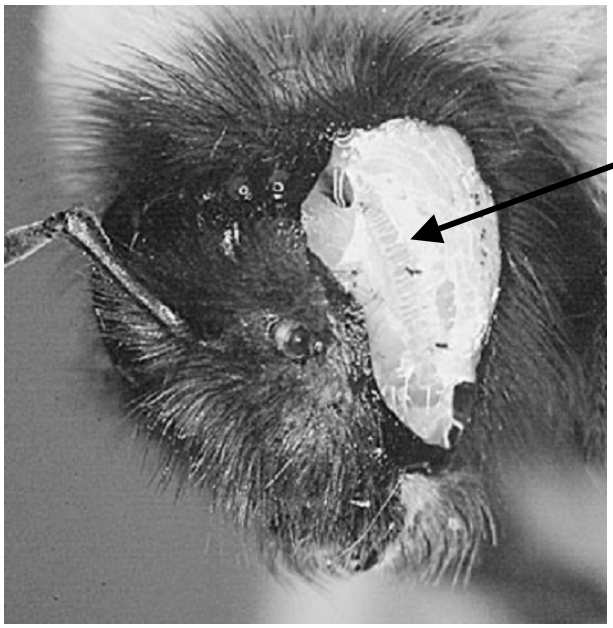

Figure 16. Dissection d'une glande labiale céphalique.

Figure 17. Glandes labiales céphaliques dans 200 µl d'hexane.

2.4. Protocole expérimental

Un papier filtre imprégné ou non d'une source d'odeur est déposé dans chaque angle de l'arène expérimentale. Dans deux des angles, on dépose 2,5 µl de solution de sécrétions des glandes labiales céphaliques de mâles consubpécifiques ou non, ou de mâles d'âges différents. Dans les deux autres angles, on dépose d'un côté un papier filtre vierge, de l'autre un papier filtre imbibé de 2,5 µl d'hexane pur. La quantité utilisée (2,5 µl) a été déterminée par essai-erreur par Sinkevich (2006). La position des différentes sources d'odeur dans le dispositif expérimental est établie aléatoirement lors de chaque manipulation (tirage au sort à l'aide de dés). Pour éviter tout apprentissage, un même bourdon n'est utilisé plusieurs fois qu'à des jours et des heures différents. Toutes les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions de température et d'humidité que celles de la salle d'élevage et en lumière rouge.

Les manipulations nécessaires à la capture de la reine lui causent un grand trouble. Son introduction sans ménagement dans l'arène expérimentale peut entraîner des comportements anormaux. Pour éviter ce problème, la reine est d'abord placée sous une boîte de Pétri munie d'un fil, au centre de l'arène expérimentale. Après 1 à 2 min, une traction délicate sur la boîte de Pétri libère le spécimen. L'enregistrement et les observations commencent alors, l'expérimentateur restant toujours au même endroit. L'analyse consiste à relever toutes les 5 secondes pendant 7 minutes, dans quelle zone la reine se situe. Chaque expérience est répétée 33 fois, avec une nouvelle.

Le pouvoir attractif des sources peut être mis en évidence en comparant le nombre de présence dans chacune des quatre zones prédéfinies.

2.5. Contrôle

Pour la validité des expériences, il est nécessaire de s'assurer qu'aucune influence, autre que les sources odorantes testées, n'agit sur les reines.

Pour ce faire, le comportement d'une série de reines est enregistré et analysé au cours d'une journée dans les mêmes conditions expérimentales que les tests mais sans source odorante. Si la reine se déplace de manière différente à chaque expérience, si sa localisation dans l'aire expérimentale est aléatoire, on peut conclure que, statistiquement, aucun signe extérieur ou intérieur au dispositif expérimental n'influence sa position.

2.6. Nettoyage

L'arène expérimentale est lavée à l'acétone. L'acétone, lui même, s'évapore rapidement et ne laisse aucun résidu.

2.7. Analyses statistiques

La distribution des 2772 relevés (84 positions X 33 reines) est analysée à l'aide d'un test chi² non paramétrique qui compare la distribution observée à celle théorique (21 présences dans chaque zone). Ceci permet de savoir si les reines préfèrent une des quatre sources odorantes.

Pour savoir si les 2 sécrétions céphaliques testées ont un effet sur les reines vierges, on analyse statistiquement (chi²), la différence entre les relevés qui correspondent au solvant et ceux qui correspondent à la sécrétion céphalique consubspécifique (de la même sous-espèce) ou non.

Ensuite, pour savoir si l'une des deux sécrétions céphaliques présentées a un effet supérieur à l'autre, on analyse la différence entre les résultats qui correspondent aux deux sécrétions céphaliques utilisées.

Le test chi² non paramétrique permet d'analyser deux variables qualitatives non appariées, les extraits et les reines qui ont chacune leur propre comportement. L'hypothèse

nulle, lorsqu'on analyse les relevés des 4 zones, est que les reines se positionnent aléatoirement: leur nombre de présence dans chacune des quatre zones étant alors similaires et voisin de 21. Autrement dit, les reines passent 25% de leur temps dans chacune des 4 zones. L'hypothèse nulle, lorsqu'on analyse les relevés de 2 zones, est que les reines se positionnent aléatoirement: leur nombre de présence dans chacune des deux zones étant alors similaires et voisin de 42. Autrement dit, les reines passent 50% de leur temps sur chacune des 2 zones (Siegel & Castellan, 1988).

Les données sont encodées et gérées au moyen du tableur Excel.

2.8 Modifications apportées

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude préliminaire sur le pouvoir attractif des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de différentes sous-espèces sur les reines vierges de *B. t. dalmatinus*, on a décidé de reproduire ces expériences dans des conditions plus rigoureuses. Les modifications suivantes sont ajoutées:

Tableau 1. Comparaison des deux séries d'expériences

	Première série	**Seconde série**
Arène expérimentale	- pas d'aération - treillis (grille soudée en "quadro plast")	- aération (1) - treillis en acier galvanisé (2)
Sujets testés	- reines de *B. t. dalmatinus*	- reines de *B. t. dalmatinus* - reines de *B. t. xanthopus* (3)
Solutions testées	- *B. t. dalmatinus* - *B. t. sassaricus* - *B. t. canariensis* - *B. t. lusitanicus* - *B. t. terrestris.*	- *B. t. dalmatinus* - *B. t. sassaricus* - *B. t. canariensis* - *B. t. xanthopus* - *B. ignitus* (4)
Protocole		- Permutations et combinaisons aléatoires des sécrétions (5)
Temps d'observation	- 7 min (avec 33 répétitions)	- 5 min (avec 10 répétitions) (6)
Nettoyage	- acétone	- détergent puis éthanol (7)

(1): Trois petits trous sont percés à chaque coin de la plaque de polycarbonate qui recouvre l'arène expérimentale afin de permettre la dissipation partielle des molécules volatiles odorantes. De cette manière, on évite une saturation du milieu expérimental.

(2): Le treillis circulaire au centre de l'arène est remplacé par un treillis en acier galvanisé afin d'éviter tout risque d'adsorption de molécules odorantes.

(3): Afin de s'assurer que les reines vierges d'autres sous-espèces réagissent comme les reines de *B. t. dalmatinus*, on réalise la nouvelle série d'expériences avec des reines

vierges de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus*. Les trente-cinq reines vierges *de B. t. xanthopus*, Kriechbaumer ont été fournies par le laboratoire du Prof. L. Chittka.

(4): Des reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* ont été testées en présence de sécrétions de glandes labiales céphaliques de mâles de *B. t. dalmatinus, B. t. xanthopus, B. t. sassaricus, B. t. canariensis*. On utilise aussi au cours de la présente étude, *B. ignitus* Smith, espèce qui vit en Chine, au Japon et en Corée. Cette espèce aura ici un rôle de témoin, afin de vérifier la spécificité des réponses aux phéromones sexuelles. Les différentes combinaisons utilisées en présence des reines vierges de *B. t. dalmatinus* et *B.ter.xanthopus* sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2. Combinaisons des extraits des sécrétions des mâles

Reines vierges	**Extraits des sécrétions mâles**
B. t. dalmatinus	*B. t. dalmatinus* et *B. t. dalmatinus*
B. t. dalmatinus	*B. t. dalmatinus* et *B. t. xanthopus*
B. t. dalmatinus	*B. t. dalmatinus* et *B. t. sassaricus*
B. t. dalmatinus	*B. t. dalmatinus* et *B. t. canarienssis*
B .ter. dalmatinus	*B. t. dalmatinus* et *B. ignitus*

Reines vierges	**Extraits des sécrétions mâles**
B. t. xanthopus	*B. t. xanthopus* et *B. t. xanthopus*
B. t. xanthopus	*B. t. xanthopus* et *B. t. dalmatinus*
B. t. xanthopus	*B. t. xanthopus* et *B. t. sassaricus*
B. t. xanthopus	*B. t. xanthopus* et *B. t. canarienssis*
B. t. xanthopus	*B. t. xanthopus* et *B. ignitus*

(5): Le protocole expérimental est amélioré. Les positions des sources d'odeur dans le dispositif expérimental sont établies aléatoirement pour chaque manipulation (tirage au sort à l'aide de dés) et les différentes combinaisons de solutions (tab. 2) sont testées aléatoirement. On ne réalise plus la même expérience tout au long de la journée, comme c'était le cas lors des anciens tests.

(6): En raison de la rapidité de réaction des reines vis-à-vis des sécrétions lors des premières analyses, le temps d'observation est réduit à 5 minutes. Chaque expérience est répétée 10 fois au minimum, chaque fois avec une reine différente et un nouveau tirage aléatoire de la position des sources odorantes.

(7): L'arène et le treillis sont nettoyés au Panama (détergeant sans odeur, sans savon, ni phosphate) puis à l'éthanol dénaturé (5%). L'éthanol s'évapore rapidement et ne laisse pas de résidu.

2.9. Analyses statistiques du nouveau jeu de données

La distribution des 600 relevés (12 X 5 = 60 positions; 60 X 10 répétitions) est analysée à l'aide d'un test de chi² non paramétrique qui compare la distribution observée à celle théorique (=la reine est présente 25% du nombre total de relevés dans chaque zone). Ceci permet de savoir si les reines préfèrent bien une des quatre sources odorantes.

Pour savoir si les 2 sécrétions céphaliques testées ont un effet agrégatif sur la reine vierge, on analyse statistiquement (chi²), la différence entre les relevés qui correspondent au solvant et ceux qui correspondent à la sécrétion céphalique consubspécifique ou non.

Ensuite, pour savoir si l'une des deux sécrétions céphaliques présentées a un effet supérieur à l'autre, on analyse la différence entre les résultats qui correspondent aux deux sécrétions céphaliques utilisées.

Le choix du test statistique se porte sur le test chi² en raison de la présence de deux variables qualitatives non appariées. Vu le faible nombre de répétitions et l'utilisation de plusieurs reines, on a préféré travailler avec un test non paramétrique. L'hypothèse nulle est que les reines passent autant de temps dans les zones comprenant les deux sources d'odeurs (Siegel & Castellan, 1988).

La position de chaque reine a été notée toutes les 5 secondes pendant 5 minutes sur base d'enregistrements vidéo. L'intérêt de cette analyse réside dans la possibilité de retracer la succession des déplacements des reines entre les différentes zones visitées. Ceci permet, notamment, de savoir si certaines zones sont évitées (très peu de déplacements dans cette zone) ou, au contraire, préférées (les reines s'y agrègent) ou si les reines hésitent à rester dans telle ou telle zone. La représentation graphique pour rendre compte des différents déplacements établis par les reines lors de chaque type d'expérimentation est le diagramme des déplacements. On a préféré travailler en pourcents pour pouvoir comparer les différents déplacements (intra- et inter-zones) entre-eux.

Afin de compléter l'analyse, on détermine le nombre de reines qui passent le plus de temps dans chaque zone (par exemple, 5 reines sur les 10 observées visitent le plus souvent la zone qui contient telle sécrétion).

On quantifie aussi le nombre de reines qui se sont immobilisées devant l'une ou l'autre des sources. De plus, le temps médian écoulé avant immobilisation des reines a également été calculé.

Les données sont encodées et gérées au moyen du tableur Excel.

2.10. Vérification de la caste et de la virginité

Lors des expériences, il arrive que certains sujets ont un comportement supposé anormal. Ils ne se déplacent pas dans l'arène expérimentale quand ils sont libérés ou ils semblent éviter les deux sources odorantes (sécrétions céphaliques des mâles). Les sujets sont alors disséqués à la fin des expériences pour vérifier leur caste (ouvrière ou reine) et leur virginité. Ceci est rendu possible par observation de leurs ovarioles et spermathèque. Les femelles possèdent deux ovaires qui sont chacune divisée en quatre ovarioles qui produisent les œufs. Les ovarioles se prolongent en oviductes qui débouchent dans un vagin median simple. Le vagin est lui-même raccordé, par un conduit sur sa face dorsale, à la spermathèque qui conserve le sperme reçu (fig.18). Si cette spermathèque est transparente, cela signifie qu'il s'agit d'une reine vierge. Au contraire, si la reine est fécondée on observe une zone blanche au centre de la spermathèque. Cette zone correspond au point d'accumulation des spermatozoïdes (fig.19) (Alford, 1975). De plus, s'il s'agit d'une ouvrière, les ovarioles ne sont pas développées.

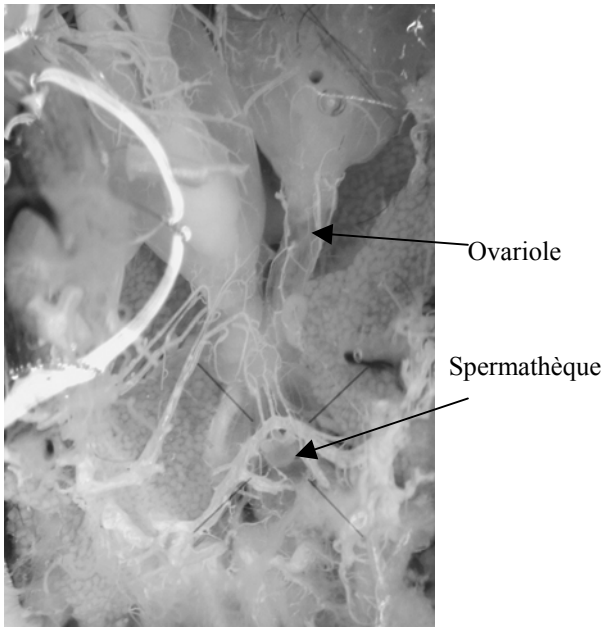

Figure 18. Appareil génital femelle (photo originale).

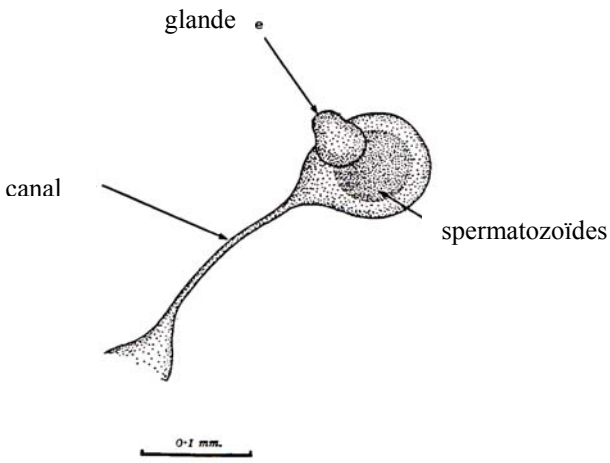

Figure 19. Aspect latéral gauche d'une spermathèque de reine fécondée (d'après Alford, 1975).

3. Résultats

3.1. Olfactométrie en fonction de l'âge

3.1.1. Contrôle

Tableau 3. Test contrôle. Nombre d'observations dans chaque zone (en %)

Expériences	Coin supérieur gauche	Coin supérieur droit	Coin inférieur droit	Coin inférieur gauche	Niveau de signification du test de chi²
Contrôle (n=43)	25	24	26	25	NS

n = nombre de reines testées; NS = test de chi² non significatif.

Les tests contrôles montrent que les reines, placées dans l'arène expérimentale sans source d'odeur, se déplacent de manière aléatoire. Les reines passent plus ou moins 25% de leur temps dans chacune des quatre zones. La distribution observée ne diffère pas significativement de la distribution théorique. Aucun facteur externe (lumière, présence de l'expérimentateur, courant d'air, source d'odeur) ne semble influencer les reines (tab. 3).

3.1.2. Temps passé dans chaque zone pour les reines de *Bombus terrestris dalmatinus*

Pour toutes les expériences, la distribution observée est de manière très hautement significativement différente de la distribution théorique. Les reines ne passent pas 25% du temps dans chacune des quatre zones. Elles semblent être influencées par les sécrétions des glandes céphaliques et passent plus de temps (sont observées un plus grand nombre de fois) dans les deux zones qui les contiennent (tab. 4).

De part les tests statistiques, il semble que les reines de *B. t. dalmatinus* se dirigent de préférence vers les sécrétions céphaliques des mâles de différents âges plutôt que vers le solvant. Une exception apparaît lorsque les reines sont en présence de sécrétion céphalique de mâles âgés de 10 et 15 jours. Dans ce cas, la sécrétion du mâle de 15 jours n'est pas préférée au solvant.

Les reines vierges de *B. t. dalmatinus* préfèrent les sécrétions céphaliques de mâles âgés de 10 ou 15 jours, puis celles des mâles de 7 jours par rapport aux mâles encore plus jeunes. Elles marquent une légère préférence pour un mâle de 7 jours par rapport à un autre de 30 jours mais leur préfèrent le témoin.

Lorsque les reines vierges ont le choix entre les sécrétions céphaliques des mâles de 10 ou 15 jours, elles passent la majeure partie de leur temps (35%) sur la zone qui contient l'extrait du mâle de 10 jours.

En résumé les mâles de 10 jours sont préférés à que ceux de 15 jours qui sont eux-mêmes préférés à ceux de 7 jours (10 jours > 15 jours > 7 jours). Viennent ensuite les mâles de 1 et 3 jours.

Tableau 4. Tests des différents âges. Nombre d'observations dans chaque zone (en %)

Age des mâles (n)	**Témoin**	**Solvant**	**Sécrétion 1**	**Sécrétion 2**	**Niveau de signification du test de chi² entre les 4 zones. H_0: 25% de leur temps dans chaque zone**	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 1. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones**	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 2. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones**	**Niveau de signification du test de chi² entre sécrétion 1 et 2. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones**
Sécrétion 1: **1 jour** Sécrétion 2: **7 jours** (n=33)	21	12	22	<u>45</u>	***	***	***	***
Sécrétion 1: **3 jours** Sécrétion 2: **7 jours** (n=33)	26	18	22	<u>34</u>	***	***	***	***
Sécrétion 1: **10 jours** Sécrétion 2: **7 jours** (n=33)	19	19	<u>39</u>	23	***	***	**	***
Sécrétion 1: **15 jours** Sécrétion 2: **7 jours** (n=33)	26	13	<u>45</u>	16	***	***	**	***
Sécrétion 1: **30 jours** Sécrétion 2: **7 jours** (n=33)	<u>36</u>	17	22	25	***	***	***	*
Sécrétion 1: **10 jours** Sécrétion 2: **15 jours** (n=33)	24	20	<u>35</u>	21	***	***	N.S	***

n = nombre de reines testées; *: $\alpha = 0,05$; **: $\alpha = 0,01$; ***: $\alpha = 0,001$; souligné: pourcentage le plus élevé; NS = test de chi² non significatif

3.2. Olfactométrie en fonction des sous-espèces

3.2.1. Première série

3.2.1.1. Contrôle

Tableau 5. Test contrôle. Nombre d'observations (temps passé) dans chaque zone (en %)

Expériences	Coin supérieur gauche	Coin supérieur droit	Coin inférieur droit	Coin inférieur gauche	Niveau de signification du test de chi²
Contrôle (n=43)	25	24	26	25	NS

n = nombre de reines testées; NS = test de chi² non significatif

Les tests contrôles montrent que les reines, placées dans l'arène expérimentale sans source d'odeur, se déplacent de manière aléatoire (tab. 5).

3.2.1.2. Nombre d'observations dans chaque zone pour les reines de *Bombus terrestris dalmatinus*

Pour chaque expérience, la distribution observée est très hautement significativement différente de la distribution théorique. Les reines marquent donc une nette préférence pour l'une des quatre zones (tab. 6).

Les tests chi² qui comparent les observations uniquement pour 2 zones, montrent que les reines de *B. t. dalmatinus* sont observées un plus grand nombre de fois dans les zones qui contiennent les sécrétions céphaliques (de leur propre sous-espèce ou non) plutôt que dans celle qui contient le solvant. Cependant, lorsque l'on compare la zone solvant à la zone qui contient la sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus*, le test chi² est non significatif. Les reines ne semblent donc pas préférer la sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus* au solvant.

Les reines préfèrent, de manière significative, les sécrétions céphaliques des mâles consubspécifiques plutôt que celles des mâles non consubspécifiques. Elles passent plus de temps, de 32 à 42% du temps, sur la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle consubspécifique.

Les reines semblent hésiter entre les zones qui présentent des sécrétions céphaliques. Les plus hauts pourcentages de temps s'observent pour les deux zones qui contiennent une sécrétion céphalique.

Tableau 6. Tests de préférence des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* envers les sécrétions céphaliques des mâles de différentes sous-espèces. Nombre d'observations (temps passé) dans chaque zone (en %).

Sous-espèce (n)	**Témoin**	**Solvant**	**Sécrétion 1**	**Sécrétion 2**	**Niveau de signification du test de chi² entre les 4 zones.** H_0: 25% de leur temps dans chaque zone	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 1.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 2.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	**Niveau de signification du test de chi² entre sécrétion 1 et 2.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones
Sécrétion 1: ***B. t. sas*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=33)	22	22	24	<u>32</u>	***	N.S	***	***
Sécrétion 1: ***B. t. can*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=33)	22	21	25	<u>32</u>	***	**	***	***
Sécrétion 1: ***B. t. lus*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=33)	16	17	25	<u>42</u>	***	***	***	***
Sécrétion 1: ***B. t. ter*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=33)	21	13	26	<u>40</u>	***	***	***	***

B. t.: Bombus terrestris; B. t. dal: Bombus terrestris dalmatinus; B. t. sas: Bombus terrestris sassaricus; B. t. can: Bombus terrestris canariensis; B. t. lus: Bombus terrestris lusitanicus; B. t. ter: Bombus terrestris terrestris; n = nombre de reines testées; *: $\alpha = 0{,}05$; **: $\alpha = 0{,}01$; ***: $\alpha = 0{,}001$; N.S: test de chi² non significatif; souligné: pourcentage le plus élevé.

3.2.2. Seconde série

3.2.2.1. Reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus*

3.2.2.1.1. Contrôle

Tableau 7. Test contrôle. Nombre d'observations (temps passé) dans chaque zone (en %)

Expériences	Coin supérieur gauche	Coin supérieur droit	Coin inférieur droit	Coin inférieur gauche	Niveau de signification du test de chi²
Contrôle (n=10)	26	22	27	25	NS

n = nombre de reines testées; NS = test de chi² non significatif

L'analyse du contrôle montre à nouveau qu'aucun facteur externe n'influence le comportement des reines. Lors des contrôles, les reines se déplacent de manière aléatoire dans les différentes zones (tab. 7).

3.2.2.1.2. Nombre d'observations dans chaque zone

Pour toutes les expériences, la distribution observée est très hautement significativement différente de la distribution théorique. Autrement dit, les reines semblent préférer certaines zones (tab. 8). Toutefois, lorsque les reines sont en présence des sécrétions céphaliques de *B. t. dalmatinus* et de *B. ignitus*, une autre espèce qui appartient au même sous-genre, le test chi² est non significatif. Il semble, que dans ce cas, les reines passent 25% du temps dans chaque zone.

Les reines de *B. t. dalmatinus* préfèrent de manière significative les sécrétions céphaliques des mâles de sous-espèces différentes ou non plutôt que le solvant.

Cependant, une exception apparaît lorsque les reines sont en présence de sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis*. Dans ce cas, elles ne préfèrent pas les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. canariensis* par rapport au solvant.

Lorsqu'on compare la zone solvant à la zone qui contient la sécrétion céphalique de *B. ignitus*, on observe une différence significative au seuil de 95%. Les reines préfèrent la sécrétion céphalique de *B. ignitus* au solvant. Cependant dans le test statistique précédent où l'on compare les quatre zones, le test chi² est non significatif. Ce qui signifie que les reines passent autant de temps dans les quatre zones.

Lors de l'expérience témoin, où l'on présente aux reines deux sécrétions céphaliques de mâles de la même sous-espèce, les reines passent autant de temps sur les deux zones qui contiennent les sécrétions céphaliques. Les distributions observées ne diffèrent pas significativement des distributions théoriques.

Face aux sécrétions céphaliques de mâles de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. sassaricus* ou *B. ignitus*, les reines ne semblent pas préférer l'une des deux sécrétions céphaliques (différence non significative).

En revanche, les reines de *B. t. dalmatinus* marquent une préférence très significative voire très hautement significative pour les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce plutôt que pour celles des mâles de *B. t. canariensis* et de *B. t. xanthopus*.

Les reines passent plus de temps sur les deux zones qui présentent une source olfactive.

Les reines passent, de 33 à 39% de leur temps, sur les zones où l'on a déposé les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus*. De plus, les relevés indiquent une préférence des reines pour les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce.

Tableau 8. Tests de préférence des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* envers les sécrétions céphaliques des mâles de différentes sous-espèces. Nombre d'observations (temps passé) dans chaque zone (en %)

Sous-espèce (n)	Témoin	Solvant	Sécrétion 1	Sécrétion 2	Niveau de signification du test de chi² entre les 4 zones. H_0: 25% de leur temps dans chaque zone	Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 1. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 2. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	Niveau de signification du test de chi² entre sécrétion 1 et 2. H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones
Sécrétion 1: ***B. t. dal* 1** Sécrétion 2: ***B. t. dal* 2** (n=10)	15	12	40	33	***	***	***	N.S
Sécrétion 1: ***B. t. xanth*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=10)	19	14	28	39	***	***	***	**
Sécrétion 1: ***B. t. sas*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=10)	15	20	30	35	***	***	***	N.S
Sécrétion 1: ***B. t. can*** Sécrétion 2: ***B .t. dal*** (n=10)	17	24	22	37	***	N.S	***	***
Sécrétion 1: ***B. ign*** Sécrétion 2: ***B. t. dal*** (n=10)	26	22	29	23	N.S	*	N.S	N.S

B. t. dal: Bombus terrestris dalmatinus; B. t. xanth: Bombus terrestris xanthopus; B. t. sas: Bombus terrestris sassaricus; B. t. can: Bombus terrestris canariensis; B. ign: Bombus ignitus; n = nombre de reines testées; *: α = 0,05; **: α = 0,01; ***: α = 0,001; N.S: test de chi² non significatif; souligné: pourcentage le plus élevé

3.2.2.1.3. Diagrammes des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus*

a) Contrôle

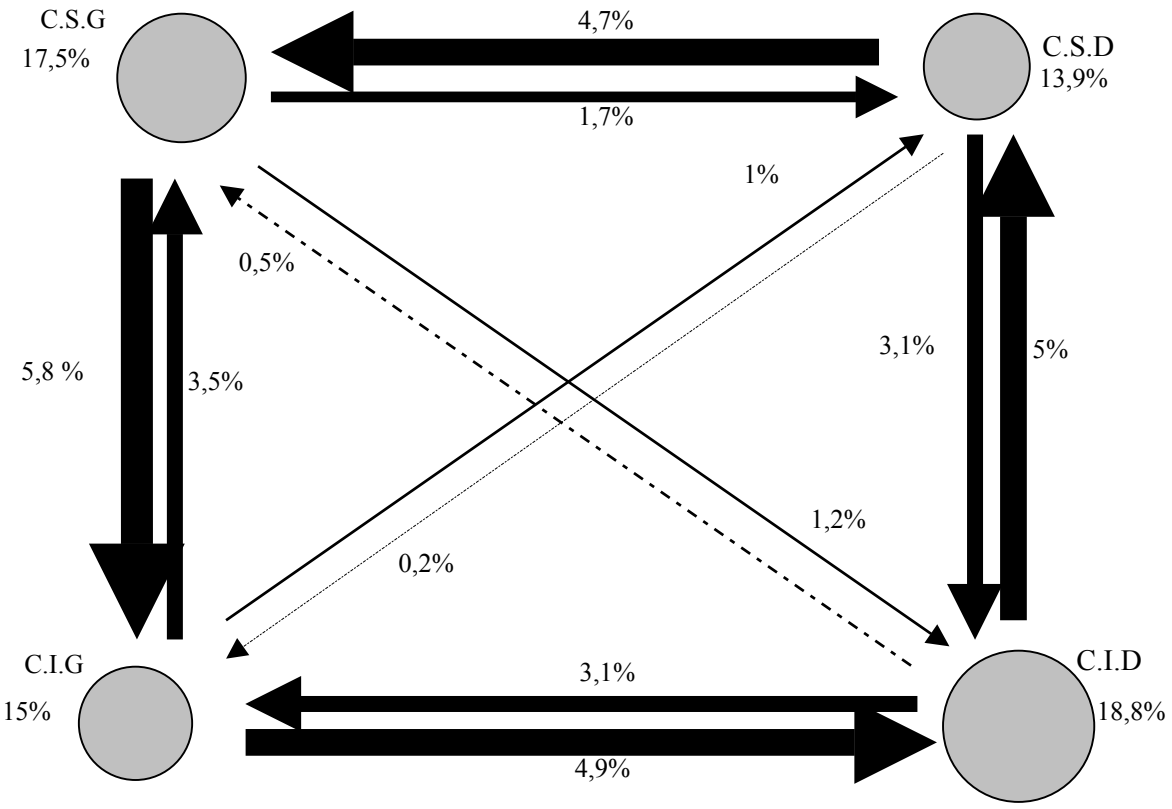

Figure 20. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en l'absence de sécrétions céphaliques. C.S.G: coin supérieur gauche; C.S.D: coin supérieur droit; C.I.D: coin inférieur droit; C.I.G: coin inférieur gauche.

Les reines semblent explorer les différentes zones de manière similaire. Les déplacements intra zone sont peu nombreux (de 13,9% à 18,8%). Les déplacements inter zones sont relativement fréquents (de 0,2% à 5,8%). On observe un faible déplacement entre les zones placées sur une diagonale (de 0,2 à 1,2% des déplacements). Au contraire, les déplacements circulaires sont relativement fréquents. Les reines semblent tourner en rond. Les déplacements en sens anti-horlogique sont légèrement plus fréquents (de 4,7 à 5,8%) que ceux en sens horlogique (de 1,7% à 3,5%).

b) Reines de Bombus terrestris dalmatinus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris dalmatinus *et de* Bombus terrestris dalmatinus

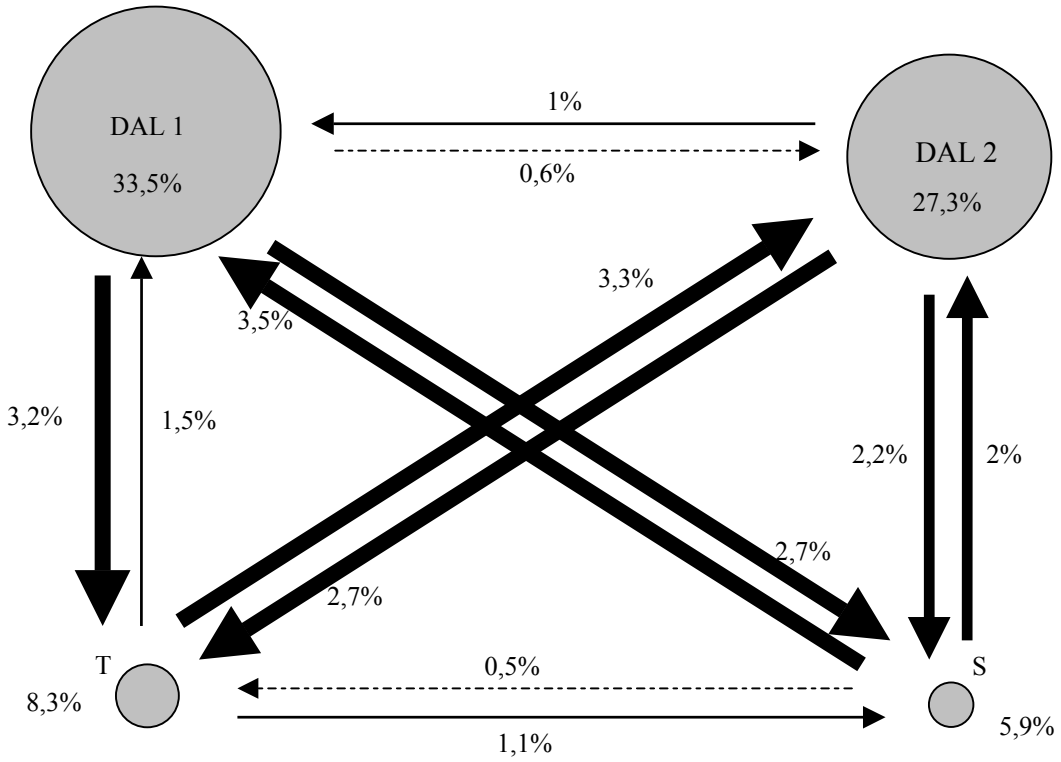

Figure 21. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris dalmatinus*.
Dal: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus*, T: zone témoin (papier filtre sans solution), S: zone avec solvant.

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (8,3% et 5,9%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus*. Les déplacements dans les zones *dalmatinus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 20). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que précédemment (de 0,5 à 3,2%). Les reines se déplacent donc de préférence vers certaines directions, elles ne tournent plus en rond.

Les reines semblent explorer de manière égale les deux zones à sécrétions céphaliques identiques (33,5% et 27,3%).

Les déplacements diagonaux sont nettement plus fréquents que précédemment (de 2,7 à 3,5%). Les déplacements entre les zones qui présentent des sécrétions céphaliques et les zones témoin ou solvant sont relativement fréquents.

L'analyse des enregistrements vidéo confirme la préférence des reines pour les zones qui présentent une sécrétion céphalique des mâles de leur propre sous-espèce. Généralement, dès que la reine perçoit cette source d'odeur, elle s'immobilise devant elle et ne bouge plus.

c) Reines de Bombus terrestris dalmatinus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris dalmatinus *et de* Bombus terrestris xanthopus

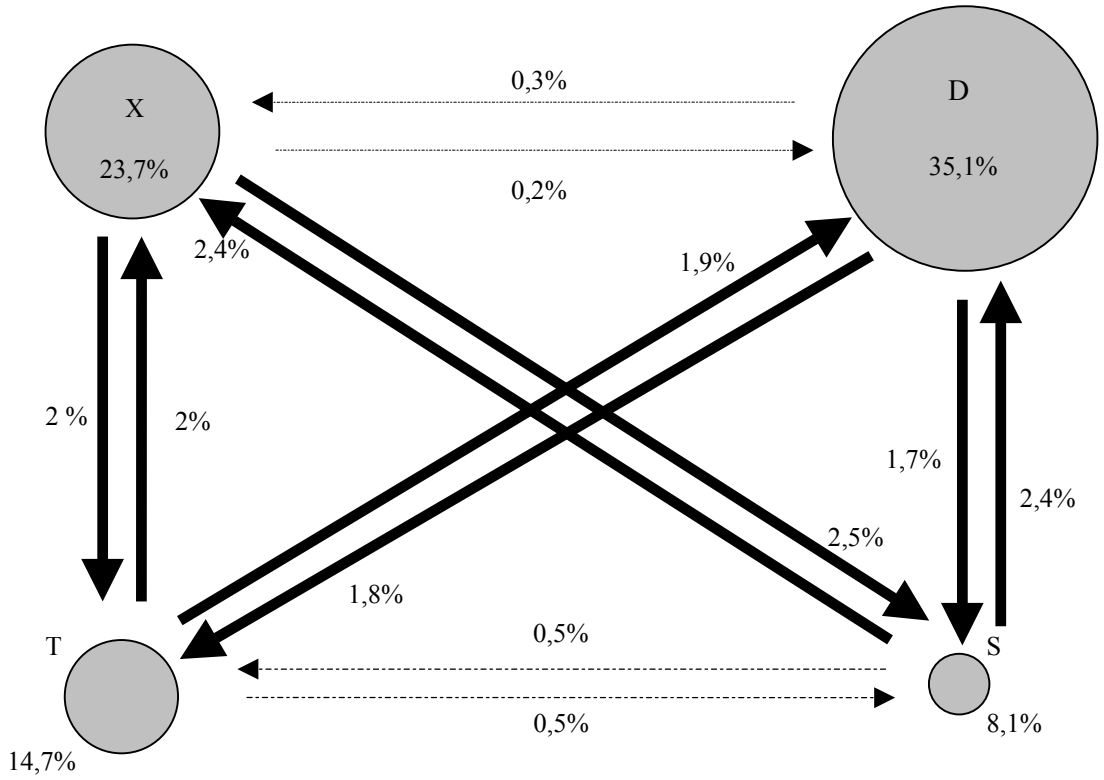

Figure 22. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris xanthopus*. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; D: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus;* T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *damatinus* et *xanthopus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 20). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que ceux observés lors du contrôle (de 0,2 à 2,4%). Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire (ne tournent pas en rond).

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (8,1% et 14,7%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* (35,1% et 23,7%).

Les reines visitent plus fréquemment la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (35,1%) que celle qui contient la sécrétion céphalique du mâle de *B. t. xanthopus* (23,7%).

Les déplacements diagonaux sont assez fréquents (de 1,8 à 2,5%), ainsi que ceux entre les zones qui présentent des sécrétions céphaliques et les zones témoin ou solvant. Par contre, les déplacements entre les zones à sécrétions céphaliques (0,2% et 0,3%) et entre les zones témoin et solvant (0,5%) sont rares. Les reines ne semblent pas hésiter entre les deux sécrétions céphaliques ni entre le témoin et le solvant. De manière générale, les de déplacements entre les zones (de 0,2% à 2,5%) sont moins fréquents que précédemment (de 0,5% à 3,5%) (fig. 21). Les reines semblent moins hésiter entre les 4 sources odorantes.

d) Reines de Bombus terrestris dalmatinus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris dalmatinus *et de* Bombus terrestris sassaricus

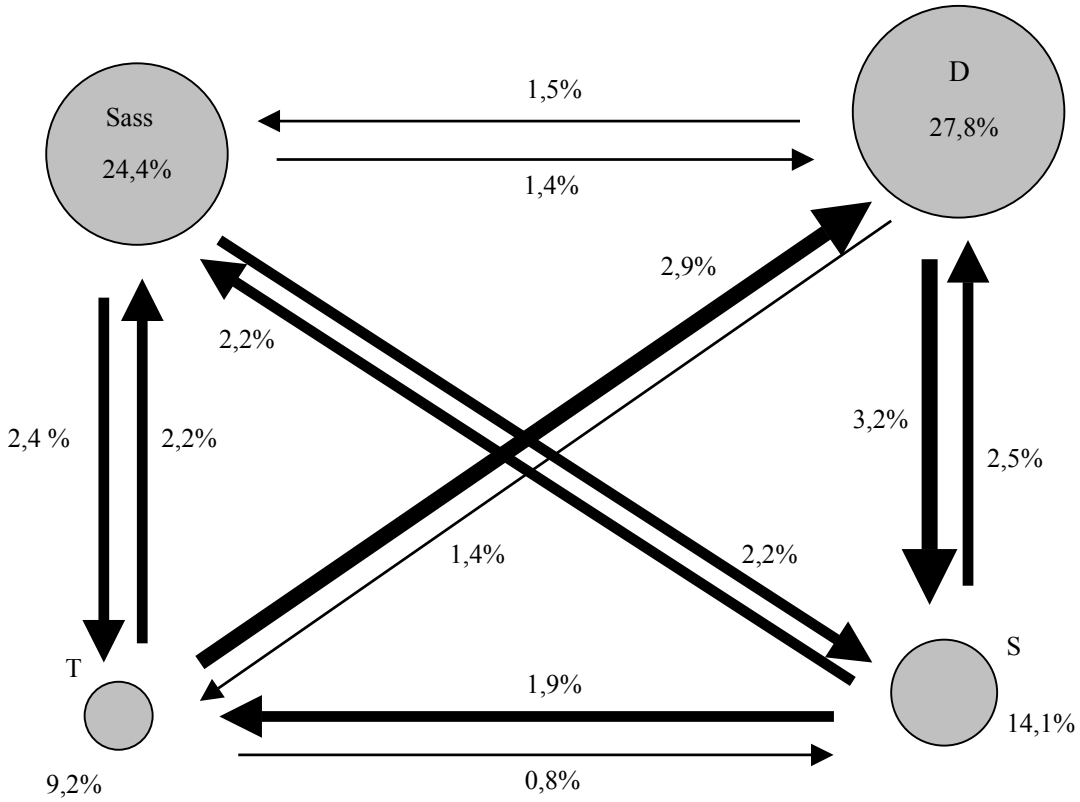

Figure 23. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris sassaricus*.
Sass: zone à sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus*; D: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus;* T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *dalmatinus* et *sassaricus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 20). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que lors du contrôle (de 0,8 à 3,2%). Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire mais se dirigent de préférence vers certaines directions.

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (9,2% et 14,1%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. sassaricus*.

Les reines visitent plus fréquemment la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle consubspécifique (27,8%) que celle qui contient la sécrétion céphalique du mâle de *B. t. sassaricus* (24,4%), mais la différence est relativement faible.

Les déplacements diagonaux sont assez fréquents (de 1,4 à 2,9%) surtout de la zone témoin vers la zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus.* Il en est de même des déplacements entre les zones qui présentent des sécrétions céphaliques et les zones témoin ou solvant (2,2% à 3,2%), les déplacements de la zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus* vers la zone solvant étant les plus fréquents. Il est plus rare d'observer des déplacements entre les zones à sécrétions céphaliques (1,4% et 1,5%) et entre les zones témoin et solvant (0,8% et 1,9%). Les reines semblent peu hésiter entre ces deux zones.

e) Reines de Bombus terrestris dalmatinus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris dalmatinus *et de* Bombus terrestris canariensis

Les déplacements dans la zone *dalmatinus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 20). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que lors du contrôle et ne varient que de 1,4% à 2,9%. Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire, elles ne tournent plus en rond comme c'est le cas lors du contrôle.

Les zones témoin (9,8%), solvant (15,8%) et même la zone à sécrétion céphalique de *B. t. canariensis* (16,1%) sont moins visitées que la zone qui présente la sécrétion céphalique du mâle de *B. t. dalmatinus*(30,7%).

Les déplacements diagonaux sont très fréquents (de 2,7 à 3,7%). Les reines hésitent peu entre les deux sécrétions céphaliques, elles se dirigent de préférence vers la sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus* (2,2%) plutôt que vers la sécrétion céphalique de *B. t. canariensis* (1%).

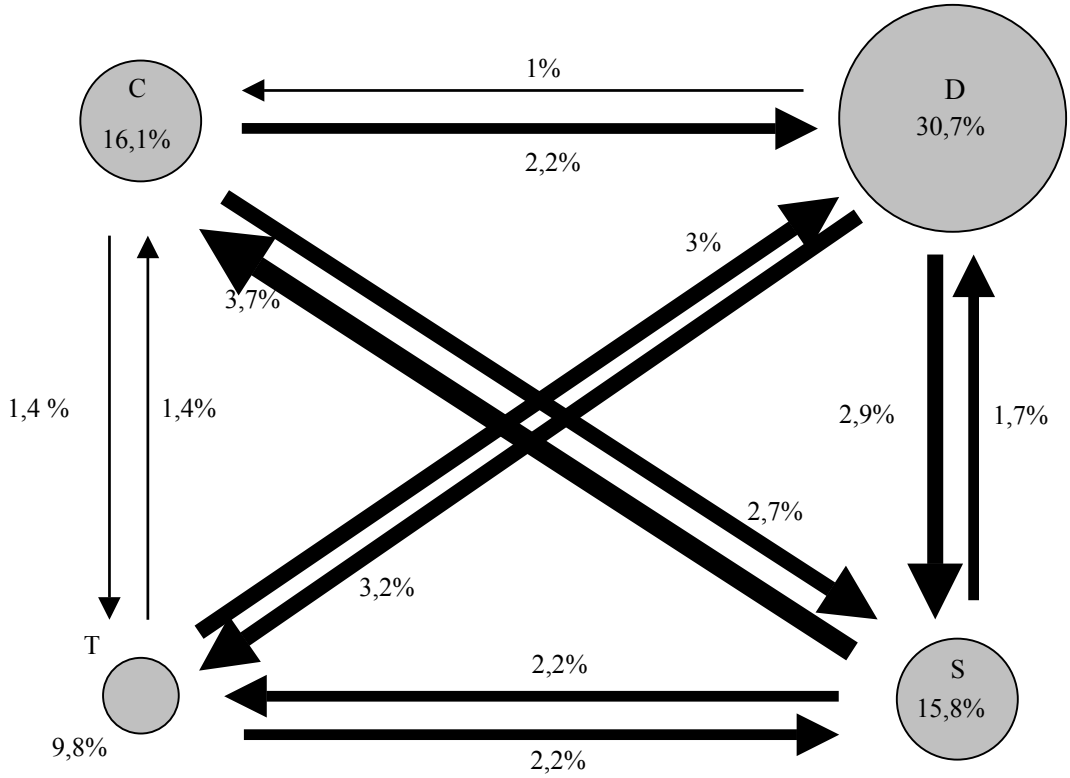

Figure 24. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris canariensis*. C: zone à sécrétion céphalique de *B. t. canariensis*; D: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus;* T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

f) Reines de Bombus terrestris dalmatinus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris dalmatinus *et de* Bombus ignitus

Les déplacements dans les zones *ignitus* et témoin sont plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 20). Les déplacements dans le sens horlogique et anti-horlogique sont moins fréquents que ceux s'effectuant lors du contrôle (de 1,1 à 3,8%). Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire, elles ne tournent plus en rond comme c'est le cas lors du contrôle (fig. 25).

La zone solvant (8,7%) et la zone à sécrétion céphalique consubspécifique (10,6%) sont moins visitées que la zone témoin (28%) et la zone qui présente la sécrétion céphalique du mâle de *B. ignitus* (24,5%). Les reines visitent plus fréquemment la zone témoin.

Les déplacements diagonaux sont assez fréquents (de 1% à 3,3%), les déplacements les plus nombreux allant de la zone témoin vers la zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus*. Quant aux autres déplacements, les plus nombreux sont ceux allant de la zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus* vers celle à sécrétion céphalique de *B. ignitus* (3,2%) et ceux allant de la zone solvant vers la zone témoin (3,8%). De manière générale, les déplacements entre les zones sont plus fréquents (de 1 à 3,8%) que lors des tests précédents

(fig. 21, fig. 22, fig. 23). Les déplacements dans les zones à sécrétions céphaliques (10,6% et 24,5%) sont moins importants que lors des tests précédents (27,3% et 33,5%; 23,7% et 35,1%; 24,4% et 27,8%; 16,1% et 30,7%) (fig. 21, fig. 22, fig. 23, fig. 24). Il semble que les reines sont agitées face aux sécrétions céphaliques de *B. ignitus*.

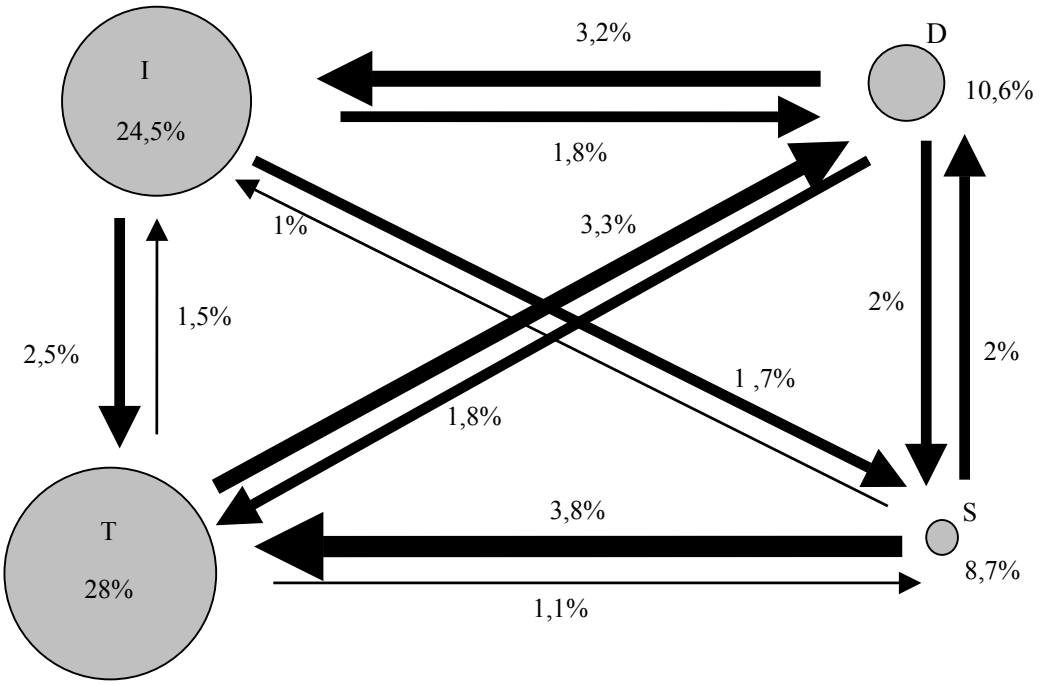

Figure 25. Diagramme des déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris dalmatinus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus ignitus*. I: zone à sécrétion céphalique de *B. ignitus*; D: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus;* T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

3.2.2.1.4. Visites et arrêt des reines

a) Zones les plus visitées par les reines de Bombus terrestris dalmatinus

Pour s'assurer de la préférence des reines pour les mâles de leur propre sous-espèce, on détermine pour chaque reine quelle est la zone qui a été la plus visitée (fig. 26).

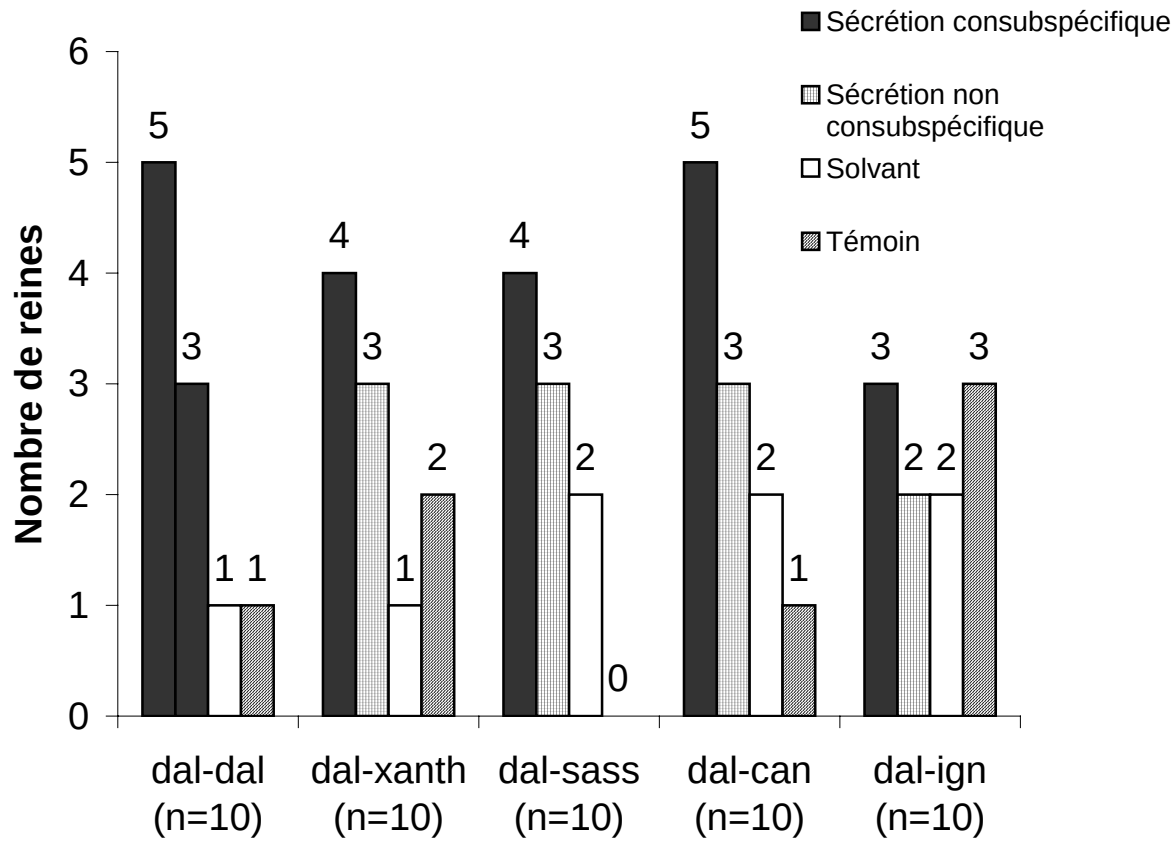

Figure 26. Nombre de reines qui ont passé le plus de temps sur une des quatre zones. dal: *B. t. dalmatinus*; xanth: *B. t. xanthopus;* sass: *B. t. sassaricus;* can: *B. t. canariensis;* ign: *B. ignitus;* n = nombre de reines testées. Remarque: si une reine a passé autant de temps sur deux zones, on comptabilise l'observation deux fois (une fois dans chacune des deux zones).

Lors du contrôle où l'on présente aux reines deux sécrétions céphaliques consubspécifiques, on n'observe pas un même nombre de reines sur les deux zones à sécrétions céphaliques identiques. Cela est probablement dû aux arrêts aléatoires sur l'une des deux zones ou à des quantités différentes de phéromones déposées dans chacune des 2 zones.

Lors des expériences réalisées en utilisant *B. t. dalmatinus*, *B. t. xanthopus*, *B. t. sassaricus* et *B. t. canariensis*, un plus grand nombre de reines visite de préférence la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle consubspécifique.

Lorsque les reines sont en présence de sécrétions céphaliques de *B. ignitus*, le nombre de reines qui passent le plus de temps sur la zone qui présente la sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus* est égal au nombre de reines qui passent le plus de temps sur la zone qui contient la sécrétion céphalique de *B. ignitus*.

b) Nombre de reines arrêtées devant chaque zone

Tableau 9. Nombre de reines arrêtées devant chaque zone et durée d'arrêt.
Temps médian en sec, depuis le début de l'expérience

Sous-espèces testées	Reines testées	Sécrétion 1.	Sécrétion 2	Témoin	Solvant	Non arrêtées	Nombre de reines testées
Sécrétion 1: *dal* Sécrétion 2: *dal*	*dal*	3 (t=40)	2 (t=25)	1 (t=190)	-	4	(n=10)
Sécrétion 1: *dal* Sécrétion 2: *xanth*	*dal*	4 (t=130)	2 (t=118)	2 (t=235)	-	2	(n=10)
Sécrétion 1: *dal* Sécrétion 2: *sass*	*dal*	4 (t=120)	1 (t=200)	-	1 (t=280)	4	(n=10)
Sécrétion 1: *dal* Sécrétion 2: *can*	*dal*	3 (t=35)	-	-	-	7	(n=10)
Sécrétion 1: *dal* Sécrétion 2: *ign*	*dal*	-	1 (t=30)	1 (t=240)	-	8	(n=10)

t: temps médian en seconde; *dal: B. terretris dalmatinus; xanth: B. t. xanthopus; sass: B. t. sassaricus; can: B. t. canariensis; ign: B. ignitus;* n: nombre d'observations

Lors du contrôle où l'on présente aux reines deux sécrétions céphaliques consubspécifiques, 4 reines ne se sont jamais arrêtées (4 reines sur 10). En revanche, celles qui se sont immobilisées devant les sécrétions céphaliques, l'ont fait rapidement (t médian= 25s et 40s).

Lors des expériences où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. xanthopus ou de B. t. sassaricus,* un plus grand nombre de reines s'immobilisent devant la sécrétion consubspécifique. Lors de l'expérience où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. sassaricus*, les reines s'immobilisent devant la sécrétion consubspécifique plus rapidement (t=120s) que la seule reine qui s'est arrêtée devant la sécrétion céphalique non consubspécifique(t=200s). Lors de tests où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. xanthopus,* les reines se sont immobilisées un peu plus rapidement devant la sécrétion céphalique non consubspécifique (t=118s) que celles qui se sont arrêtées devant la sécrétion consubspécifique (t=130s). Le laps de temps nécessaire aux reines pour percevoir la sécrétion céphalique consubspécifique est plus long lorsque les reines sont en présence de deux sécrétions céphaliques différentes (entre 120s et 130s) que lorsqu'elles sont en présence de deux sécrétions céphaliques identiques (entre 25s et 40s).

Lors des expériences où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. canariensis ou de B. ignitus,* la majorité des reines ne s'immobilise pas. Lors de l'expérience où les reines sont en présence de sécrétions céphaliques de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis*, aucune reine ne s'immobilise devant la sécrétion non consubsécifique. Quant aux 3 reines qui se sont arrêtées devant la sécrétion céphalique, elles ont mis très peu de temps à le percevoir (t=35s). Par contre, lors de l'expérience où les reines sont en présence de sécrétions céphalique de *B. t. dalmatinus* et de *B. ignitus*, aucune reine ne s'immobilise devant la sécrétion consubspécifique. Une seule reine s'est immobilisée devant la sécrétion de *B. ignitus* et ce très rapidement (t=30s).

Le temps mis par une reine de *B. t. dalmatinus* pour s'immobiliser devant une sécrétion céphalique consubspécifique est très variable en fonction de la sécrétion céphalique non consubspécifique utilisée.

3.2.2.2. Reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus*

3.2.2.2.1. Contrôle

Tableau 10. Test contrôle. Nombre d'observations (temps passé) dans chaque zone (en %)

Expériences	Coin supérieur gauche	Coin supérieur droit	Coin inférieur droit	Coin inférieur gauche	Niveau de signification du test de chi²
Contrôle (n=10)	27	21	27	25	NS

n = nombre de reines testées; NS = test de chi² non significatif

Lors des contrôles, la distribution observée n'est pas significativement différente de la distribution théorique. Les reines ne sont influencées par aucun facteur externe lorsqu'aucune source d'odeur n'est présente dans l'olfactomètre (tab. 10).

3.2.2.2.2. Nombre d'observations dans chaque zone

Pour toutes les expériences, les distributions observées sont très hautement significativement différentes des distributions théoriques. Les reines passent donc plus de temps dans l'une des quatre zones et ne se déplacent pas de manière aléatoire dans l'arène expérimentale (tab. 11).

Les reines de *B. t. xanthopus* préfèrent très hautement significativement les sécrétions céphaliques des mâles non consubspécifiques (d'une sous-espèce différente), à l'exception de *B. t. dalmatinus,* plutôt que le solvant.

De même, les reines de *B. t. xanthopus* préfèrent de manière significative les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. xanthopus* (consubspécifique) plutôt que le solvant. Ceci n'est pas valable lorsque les reines sont en présence de deux sécrétions céphaliques de *B. t. xanthopus*, l'une des deux sécrétions céphaliques n'est pas préférée de manière significative au solvant. Ceci est probablement dû, au choix des arrêts sur l'autre sécrétion céphalique identique. Lorsque les reines sont en présence des sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. xanthopus* et de *B.ter.dalmatinus*, elles ne préfèrent pas de manière significative les sécrétions de *B. t. xanthopus* au solvant. Les reines de *B. t. xanthopus* semblent réagir de la même façon face au solvant et aux sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. xanthopus.* Ces sécrétions ne semblent pas induire d'effet agrégatif sur les reines consubspécifiques.

Pour la grande majorité des expériences, les reines préfèrent, de manière significative, une des deux sécrétions céphaliques qui leur sont présentées. Les reines de *B. t. xanthopus* préfèrent très nettement les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce. Elles passent effectivement plus de temps (de 35% à 44% de leur temps) dans les zones qui contiennent ces sécrétions céphaliques. Cependant, elles ne préfèrent pas de manière significative les sécrétions des mâles de *B. t. xanthopus* aux sécrétions des mâles de *B. ignitus*.

En conclusion, quand une reine de *B. t. xanthopus* a le choix entre des mâles de sous-espèces différentes, elle préfère les mâles de leur propre sous-espèce.

Tableau 11. Tests de préférence des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* envers les sécrétions céphaliques des mâles de différentes sous-espèces. Temps passé dans chaque zone (en %)

Sous-espèces (n)	**Témoin**	**Solvant**	**Sécrétion 1**	**Sécrétion 2**	**Niveau de signification du test de chi² entre les 4 zones.** H_0: 25% de leur temps dans chaque zone	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 1.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	**Niveau de signification du test de chi² entre solvant et sécrétion 2.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones	**Niveau de signification du test de chi² entre sécrétion 1 et 2.** H_0: 50% de leur temps dans ces 2 zones
Sécrétion 1:***B. t. xanth*1** Sécrétion 2:***B. t. xanth*2** (n=10)	22	21	<u>37</u>	20	***	***	N.S	***
Sécrétion 1: ***B. t. dal*** Sécrétion 2: ***B. t. xanth*** (n=10)	11	29	25	<u>35</u>	***	*	N.S	***
Sécrétion 1: ***B. t. sas*** Sécrétion 2: ***B. t. xanth*** (n=10)	13	11	32	<u>44</u>	***	***	***	***
Sécrétion 1: ***B. t. can*** Sécrétion 2: ***B. t. xanth*** (n=10)	22	15	26	<u>37</u>	***	***	***	***
Sécrétion 1: ***B. ign*** Sécrétion 2: ***B. t. xanth*** (n=10)	24	11	30	<u>35</u>	***	***	***	N.S

B. t. xanth: Bombus terrestris xanthopus; B. t .dal: Bombus terrestris dalmatinus; B. t .sas: Bombus terrestris sassaricus; B. t. can: Bombus terrestris canariensis; B. ign: Bombus ignitus; n = nombre de reines testées; *: α = 0,05; **: α = 0,01; ***: α = 0,001; N.S: test de chi² non significatif; souligné: pourcentage le plus élevé

3.2.2.2.3 Diagrammes de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus*

a) Contrôle

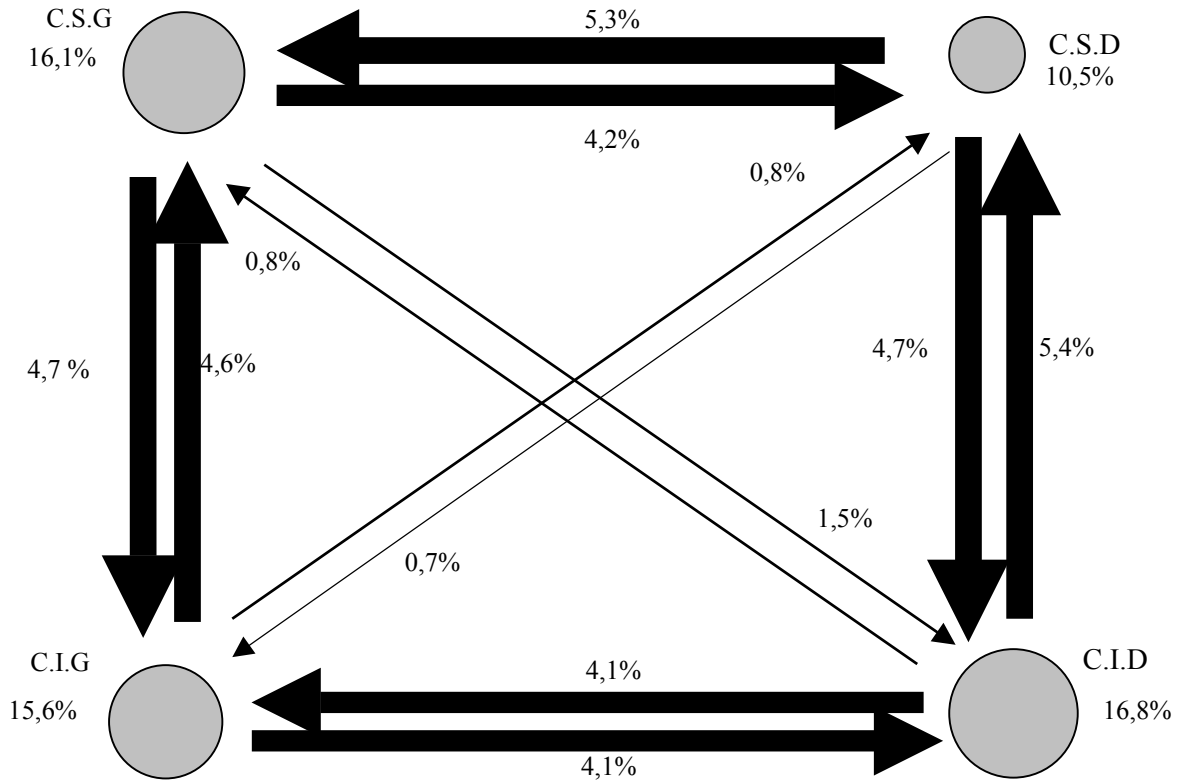

Figure 27. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en l'absence de sécrétions céphaliques. C.S.G: coin supérieur gauche; C.S.D: coin supèrieur droit; C.I.D: coin inférieur droit; C.I.G: coin inférieur gauche.

Les reines semblent explorer les différentes zones de manière équivalente. Les déplacements intra zone sont peu nombreux tandis que les déplacements inter zones sont relativement fréquents.

On observe un faible déplacement entre les zones placées sur une diagonale (de 0,7 à 1,5% des déplacements).

En revanche, les déplacements en sens horlogique et en sens anti-horlogique sont très fréquents (4,1% à 5,4%). Les reines se déplacent de manière aléatoire (elles tournent en rond).

b) Reines de Bombus terrestris xanthopus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris xanthopus *et de* Bombus terrestris xanthopus

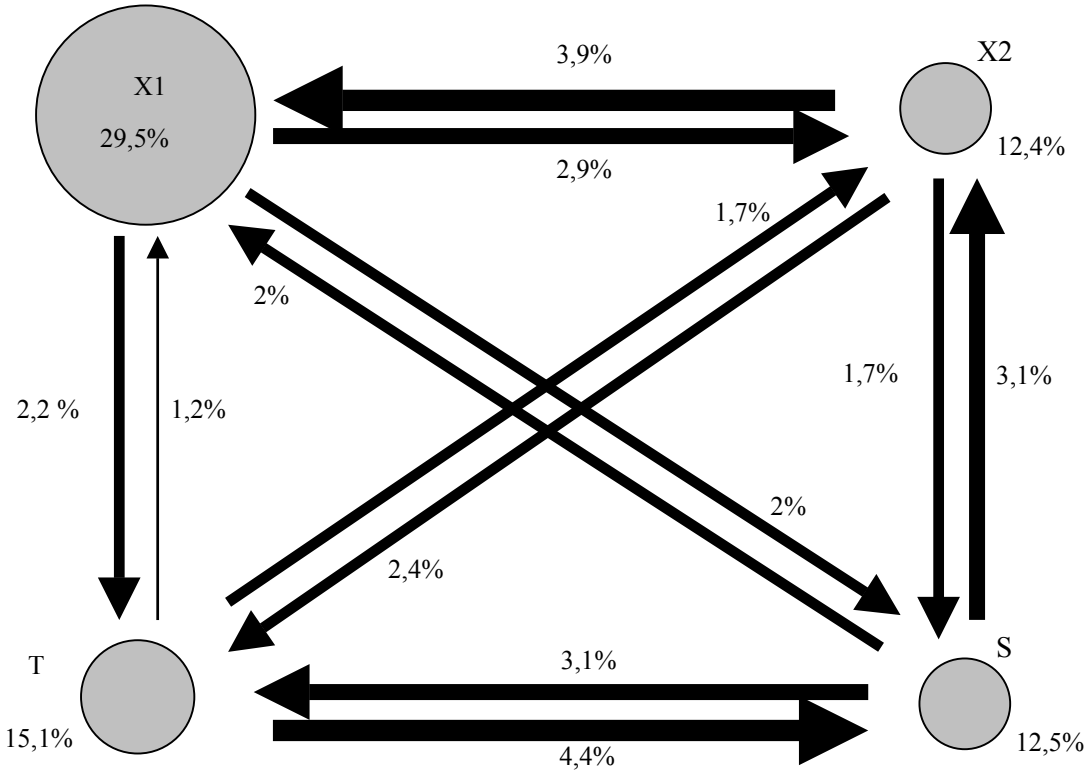

Figure 28. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris xanthopus* et de *Bombus terrestris* xanthopus. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans une des deux zones *xanthopus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 27). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que lors du contrôle (de 0,5 à 3,2%). Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire mais se dirigent de préférence dans certaines directions (fig. 28).

Les zones témoin et solvant semblent peu visitées (5,9% et 8,3%). L'une des deux zones à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus* semble beaucoup plus visitée (29,5%) que l'autre (12,4%). Ceci réside probablement dans le choix initial d'une des deux zones à sécrétions. Généralement, il semble que lorsqu'une reine a choisi une des deux sources d'odeurs, elle s'immobilise devant elle et n'en bouge plus. L'une des deux sources était peut-être plus riche en phéromone que l'autre.

Les déplacements diagonaux sont légèrement plus fréquents que précédemment (de 1,7% à 2,4%). Les déplacements les plus fréquents se retrouvent entre les deux zones à sécrétions céphaliques de *B. t. xanthopus* (2,9% et 3,9%), entre les zones témoin et solvant (3,1% et 4,4%) et de la zone solvant vers une des zones à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus* (3,1%). Les reines semblent donc hésiter à choisir l'une ou l'autre des deux sécrétions céphaliques identiques ainsi qu'entre le solvant et le témoin.

c) Reines de Bombus terrestris xanthopus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris xanthopus *et de* Bombus terrestris dalmatinus

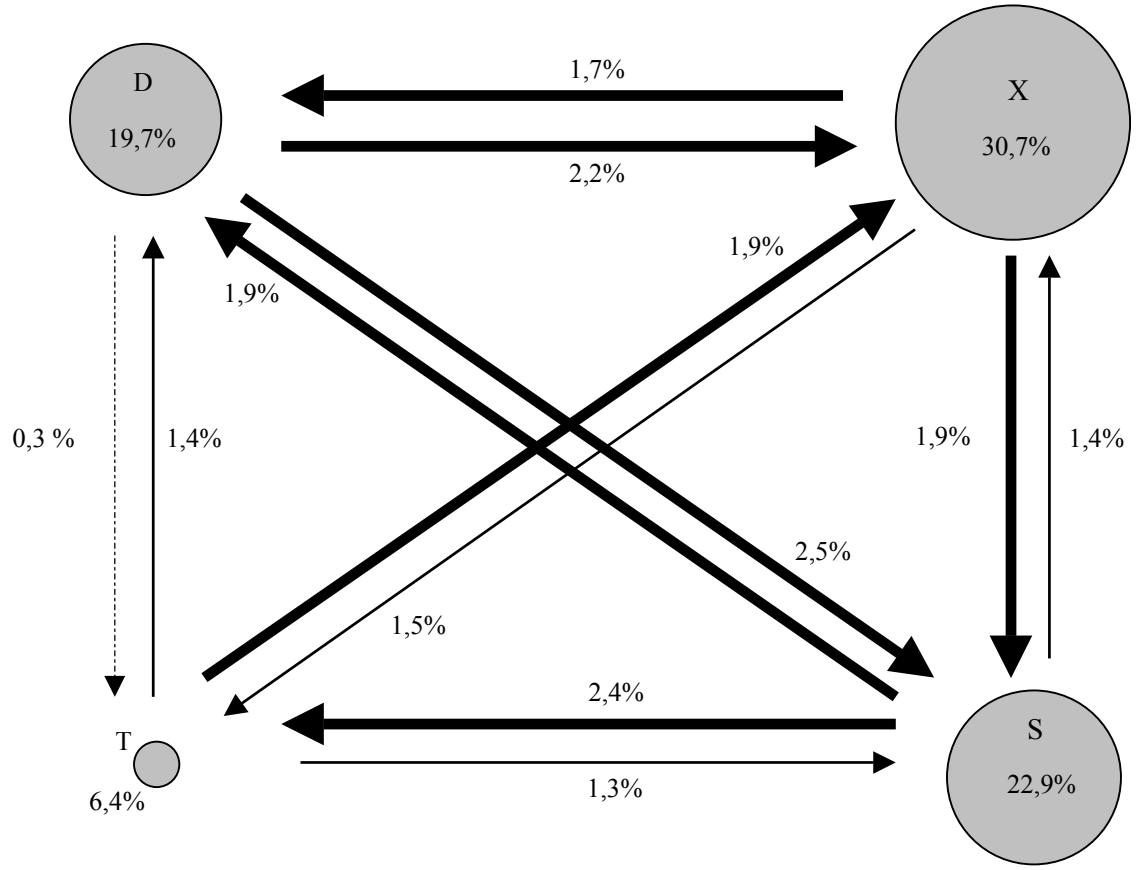

Figure 29. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris xanthopus* et de *Bombus terrestris dalmatinus*. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; D: zone à sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus*; T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *xanthopus*, *dalmatinus* et solvant sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 27).

La zone témoin est la moins visitée (6,4%). Les reines visitent plus fréquemment la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle consubspécifique (30,7%) que celle qui contient la sécrétion céphalique du mâle de *B. t. dalmatinus* (19,7%). Cette dernière est même moins visitée que la zone solvant (22,9%).

Tous les déplacements (en sens horlogogique, anti-horlogique, sur une diagonale) entre les différentes zones testées présentent plus ou moins la même fréquence. Cela peut s'expliquer par une faible hésitation de la reine entre 2 zones et par une préférence notable pour une zone. En effet, les reines s'agrègent plus longtemps dans la zone qui contient les sécrétions céphaliques de *B. t. xanthopus*.

d) Reines de Bombus terrestris xanthopus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris xanthopus *et de* Bombus terrestris sassaricus

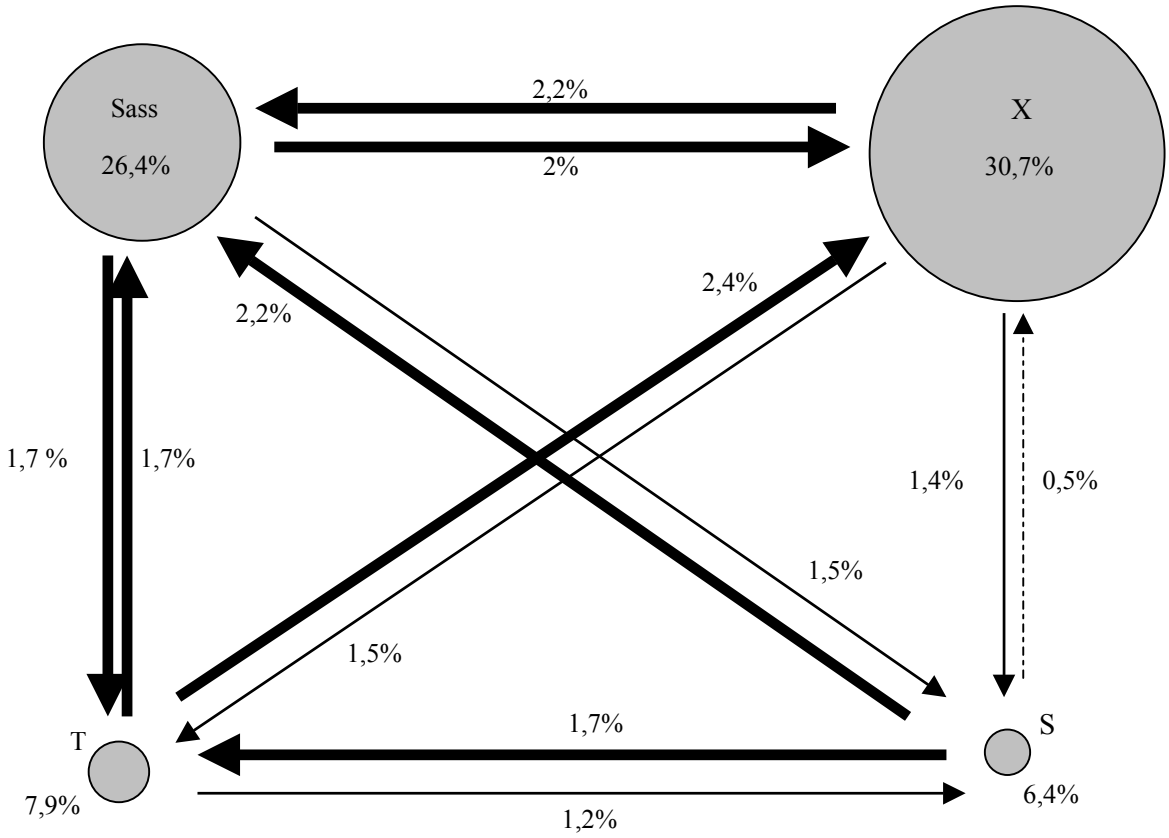

Figure 30. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris xanthopus* et de *Bombus terrestris sassaricus*. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; Sass: zone à sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus*; T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *xanthopus* et *sassaricus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 27).

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (7,9% et 6,4%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques de mâles de *B. t. xanthopus* et de *B. t. sassaricus*. Les reines visitent plus fréquemment la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (30,7%) que celle qui contient la sécrétion céphalique du mâle de *B. t. sassaricus* (26,4%). Les déplacements dans le sens horlogique ou anti-horlogique sont moins fréquents que lors du contrôle (de 0,8 à 3,2%). Il semble dès lors que les reines ne se déplacent plus de manière aléatoire (ne tournent plus en rond). Tous les déplacements (en sens horlogogique et anti-horlogique ainsi que sur une diagonale) sont plus ou moins de même fréquence. Cela peut s'expliquer par une faible hésitation de la reine entre 2 zones et par une préférence notable pour une zone. En effet, les reines s'agrègent plus longtemps dans la zone qui contient les sécrétions céphaliques de *B. t. xanthopus*.

e) Reines de Bombus terrestris xanthopus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris xanthopus *et de* Bombus terrestris canariensis

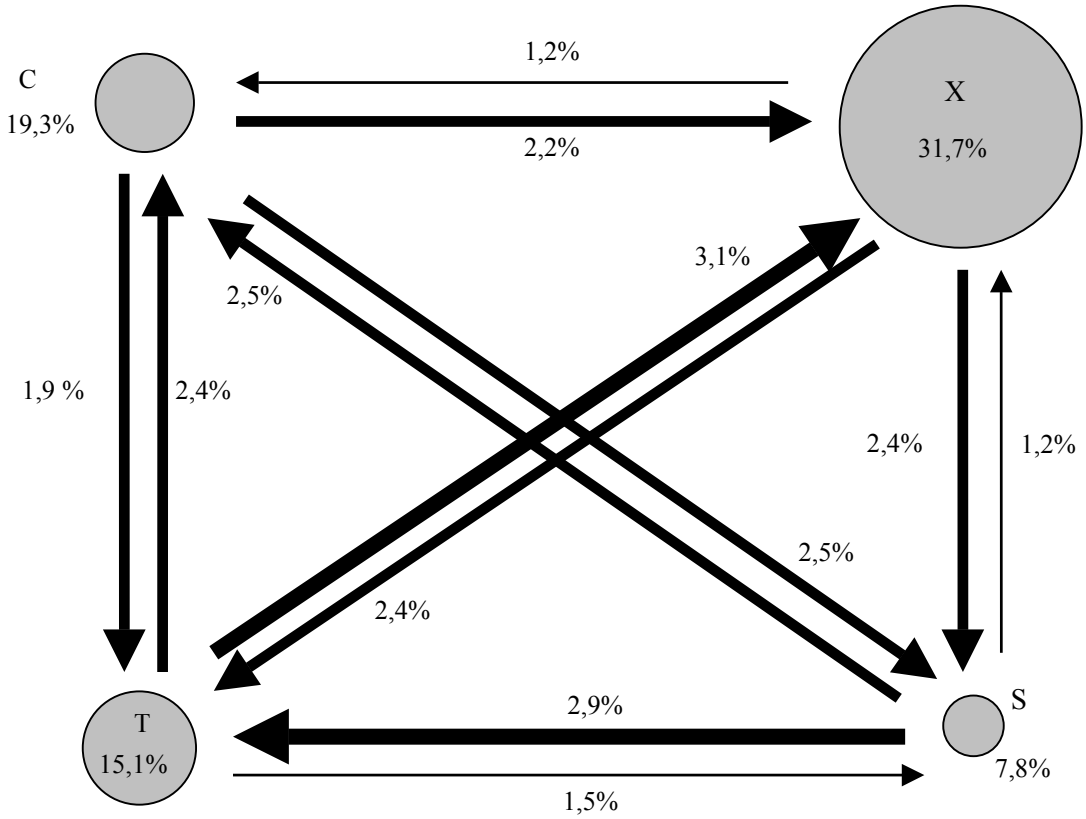

Figure 31. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris xanthopus* et de *Bombus terrestris canariensis*. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; C: zone à sécrétion céphalique de *B. t. canariensis*; T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *xanthopus* et *canariensis* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 27).

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (15,1% et 7,8%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. xanthopus* et de *B. t. canariensis*. Les reines hésitent peu entre les deux zones à sécrétion céphalique, elles se dirigent de préférence vers la sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus* (2,2%) que vers la sécrétion céphalique de *B. t. canariensis* (1,2%). Les déplacements diagonaux sont fréquents (de 2,4 à 3,1%). Les déplacements dans le sens horlogique et anti-horlogique sont moins fréquents que lors du contrôle. Ils sont assez constants (entre 2,2 et 2,9% pour le sens horlogique et entre 1,2 et 1,9% pour le sens anti-horlogique). Les reines ne se déplacent pas de manière aléatoire dans l'arène expérimentale, elles ne tournent plus en rond, elles se dirigent de préférence dans certaines directions (de la zone solvant vers la zone témoin(2,9%) et de la zone témoin vers la zone qui contient la sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus* (3,1%)).

De manière générale, les déplacements inter zones sont relativement plus importants (de 1,2% à 3,1%) que lors des deux précédents tests (de 0,3% à 2,5% et de 0,5% à 2,4%) (fig. 29 et 30). Cette agitation est probablement due à un effet d'alarme des sécrétions céphaliques de *B. t. canariensis* sur les reines.

f) Reines de Bombus terrestris xanthopus *en présence des sécrétions de* Bombus terrestris xanthopus *et de* Bombus ignitus

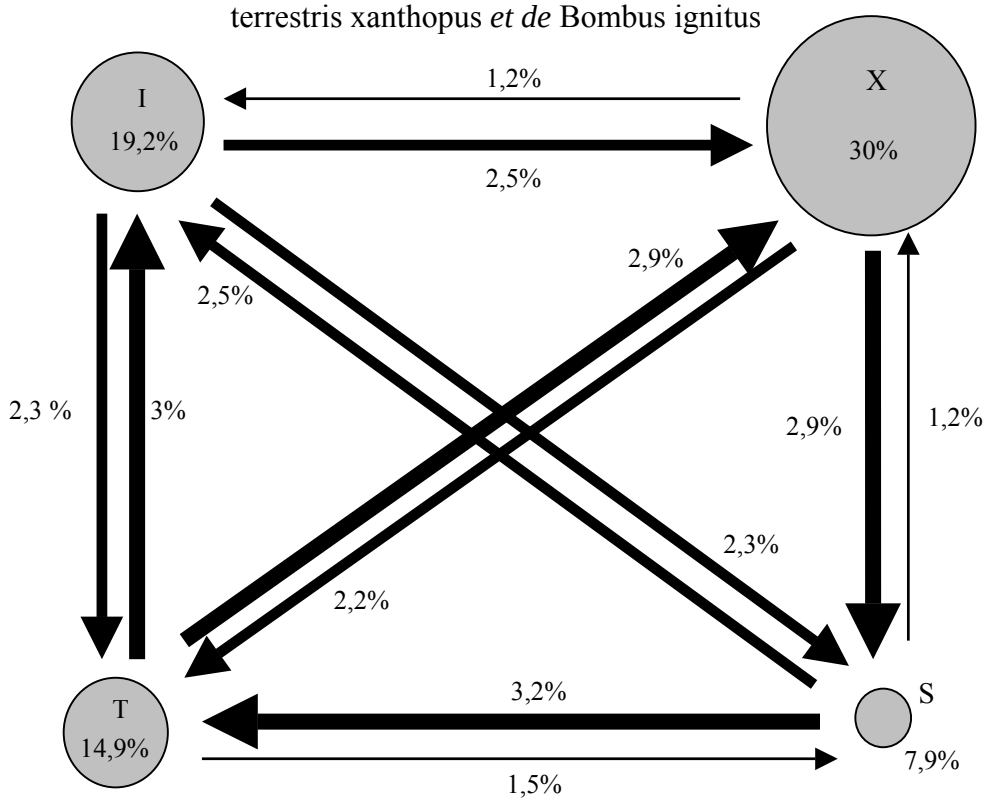

Figure 32. Diagramme de déplacements des reines vierges de *Bombus terrestris xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques de mâles de *Bombus terrestris xanthopus* et de *Bombus ignitus*. X: zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*; I: zone à sécrétion céphalique de *B. ignitus*; T: zone témoin (papier filtre sans solution); S: zone avec solvant.

Les déplacements dans les zones *xanthopus* et *ignitus* sont relativement plus fréquents que lors du contrôle. Les déplacements entre les zones sont réduits par rapport au contrôle (fig. 27).

Les zones témoin et solvant sont moins visitées (14,9% et 7,9%) que les deux zones qui présentent les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus* et de *B. ignitus*. Les reines visitent plus fréquemment la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle consubspécifique (30%) que celle qui contient la sécrétion céphalique du mâle de *B. ignitus* (19,2%) (fig. 32).

Les déplacements diagonaux sont assez fréquents (de 2,2% à 2,9 %) avec un déplacement plus fréquent de la zone témoin vers la zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus*. Les déplacements entre les zones qui présentent des sécrétions céphaliques et les zones témoin ou solvant sont assez fréquents (1,2% à 3%), avec un déplacement plus fréquent de la zone témoin vers la zone à sécrétion céphalique de *B. ignitus* (3%) et de la zone à sécrétion céphalique de *B. t. xanthopus* vers la zone à solvant (2,9%).

Comme pour le test précédent (fig. 31), les déplacements inter zones sont relativement plus importants (de 1,2% à 3,2%) que lors des deux tests précédents (de 0,3% à 2,5% et de 0,5% à 2,4%) (fig. 29 et 30). Cette agitation peut-être due à un effet d'alarme des sécrétions céphaliques de *B. ignitus* sur les reines de *B. t. xanthopus*.

3.2.2.2.4. Visites et arrêts des reines

a) Zones les plus visitées par les reines de Bombus terrestris xanthopus

Lors du contrôle, où l'on présente aux reines deux sécrétions céphaliques de leur propre sous-espèce, contrairement à ce que l'on aurait pu s'attendre, on n'observe pas le même nombre de reines sur les deux zones à sécrétions céphaliques identiques. Cela est probablement dû aux arrêts sur l'une des deux zones.

Lors de toutes les autres expériences, un plus grand nombre de reines visite de préférence la zone qui contient la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (fig. 33).

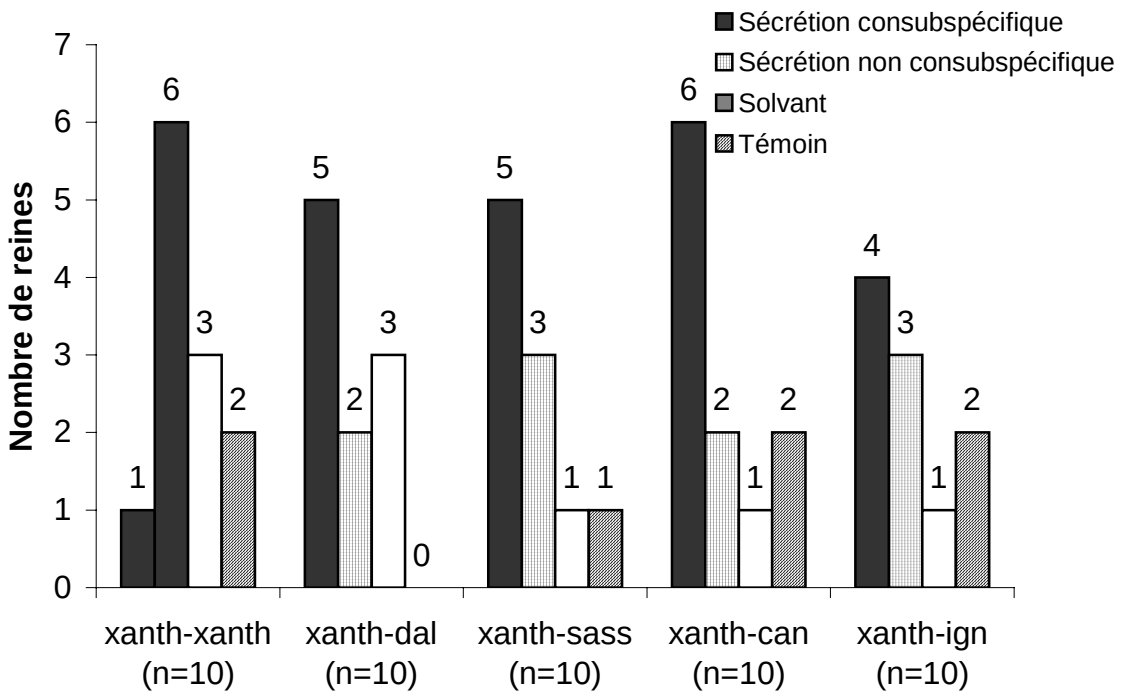

Figure 33 Nombre de reines qui ont passé le plus de temps sur une des quatre zones. *xanth: Bombus terrestris xanthopus; dal: Bombus terrestris dalmatinus; sass: Bombus terrestris sassaricus; can: Bombus terrestris canariensis; ign: Bombus ignitus;* n = nombre de reines testées. Remarque: si une reine a passé autant de temps sur deux zones, on comptabilise l'observation deux fois (une fois pour chacune des deux zones).

b) Nombre de reines arrêtées devant chaque zone

Lors du contrôle, où l'on présente aux reines deux sécrétions céphaliques consubspécifiques, la majorité des reines ne se sont pas arrêtées (6 reines sur 10). Néanmoins certaines reines s'immobilisent (3 reines) devant les sécrétions céphaliques après un temps médian relativement long (entre 123 sec. et 300 sec. valeur médiane).

Tableau 12. Nombre de reines arrêtées devant chaque zone et durée d'arrêt.
Temps médian en secondes, depuis le début de l'expérience

Sous-espèces testées	Reines testées	Sécrétion 1	Sécrétion 2	Témoin	Solvant	Non arrêtées	Nombre de reines testées
Sécrétion 1:*xanth* Sécrétion 2:*xanth*	*xanth*	2 (t=123)	1 (t=300)	1 (t=250)	-	6	(n=10)
Sécrétion 1:*xanth* Sécrétion 2:*dal*	*xant*	4 (t=100)	1 (t=25)	-	2 (t=92,5)	3	(n=10)
Sécrétion 1:*xanth* Sécrétion 2:*sass*	*xanth*	4 (t=40)	4 (t=165)	-	-	2	(n=10)
Sécrétion 1:*xanth* Sécrétion 2:*can*	*xanth*	2 (t=77,5)	2 (t=102,5)	1 (t=105)	-	5	(n=10)
Sécrétion 1:*xanth* Sécrétion 2:*ign*	*xanth*	1 (t=35)	3 (t=55)	-	-	6	(n=10)

t: temps médian en seconde; *dal*: *B. terretris dalmatinus*; *xanth: B. t. xanthopus; sass: B. t. sassaricus*; *can*: *B. t. canariensis*; *ign: B. ignitus;* n: nombre d'observations

Lors de l'expérience où l'on présente aux reines de *B. t. xanhopus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. dalmatinus,* un plus grand nombre de reines (4 reines) s'immobilisent devant la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce. Lors de l'expérience avec la sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus,* un même nombre de reines (4) se sont immobilisées devant les deux types de sécrétion. Néanmoins, les reines ont reconnu plus rapidement la sécrétion consubspécifique (t=40s contre t=165s).

Lors des expériences où l'on présente aux reines de *B. t. xanthopus* des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. canariensis ou de B. ignitus,* la majorité des reines ne s'immobilisent pas. Cependant les reines qui s'immobilisent le font plus rapidement devant les sécrétions céphaliques des mâles de leur sous-espèce (77,5 sec. et 35 sec. en médiane) que devant les sécrétions céphaliques de mâles de sous-espèce différente (102,5 sec. et 55 sec. en valeur médiane).

Le temps mis par une reine de *B. t. dalmatinus* pour s'immobiliser devant une sécrétion céphalique consubspécifique ne varie pas tellement et aléatoirement en fonction de la sécrétion céphalique non consubspécifique utilisée.

3.3. Résultats des dissections

Certaines reines adoptent des comportements anormaux. Elles s'immobilisent presque directement devant une des deux sources témoin (papier filtre sans solution et papier filtre avec hexane) sans visiter l'arène. Au total, 17 spécimens ont été écartés de l'analyse. Ils ont été disséqués à posteriori afin de s'assurer de leur caste et de leur virginité. Certaines dissections n'ont pu être menées à bien en raison d'un mauvais état de conservation du spécimen (8 spécimens). Deux spécimens se sont révélés être des reines fécondées. Leur spermathèque était opaque, c'est-à-dire remplie de spermatozoïdes, et leurs ovarioles étaient bien développées. 6 autres spécimens écartés de l'analyse avaient des ovarioles non développées et une spermathèque transparente. Ces spécimens sont probablement des grosses ouvrières.

Une reine vierge (spermathèque transparente) a présenté des ovarioles anormalement peu développées. De ce fait, son comportement anormal face aux sécrétions céphaliques pourrait s'expliquer par un manque de maturité ou un âge trop avancé.

3.4. Commentaire des résultats

3.4.1. Influence de l'âge

Lors de la première série d'expériences sur la variation de l'attractivité des mâles en fonction de leur âge, les reines de *B. t. dalmatinus* ne se déplacent pas de manière aléatoire en présence de sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques de différents âges (tab. 3). En présence des sécrétions céphaliques de mâles de 7 jours et de 1 jour, de 7 jours et de 3 jours ou de 7 jours et de 30 jours, elles passent significativement plus de temps (sont observées un plus grand nombre de fois) sur les zones à sécrétions céphaliques de mâles de 7 jours. Ces mâles sont donc préférés à ceux de 1, 3 et 30 jours. Toutefois, lorsqu'on présente aux reines des sécrétions céphaliques de mâles de 7 et 10 jours ou de 7 et 15 jours, les mâles de 10 et 15 jours semblent être préférés aux mâles de 7 jours. Enfin, face aux sécrétions de mâles de 10 et 15 jours, il semble que les reines préfèrent les sécrétions céphaliques des mâles de 10 jours (tab. 4).

Les reines vierges préfèrent donc les sécrétions céphaliques des mâles âgés de 10 jours. Ces mâles sont préférés à ceux de 15 jours qui sont eux-mêmes préférés à ceux de 7 jours. Les moins attirants sont les mâles de 1 et 3 jours.

3.4.2. Influence des différentes sous-espèces

3.4.2.1. Première série d'expériences

Lors de la première série d'expériences, les reines (n=33) de *B. t. dalmatinus* ne se déplacent pas de manière aléatoire (tab. 5). Les zones à sécrétions céphaliques des sous-espèces *dalmatinus* sont préférées très hautement significativement à celles qui contiennent les sécrétions céphaliques des sous-espèces s*assaricus*, *canariensis*, *lusitanicus* et *terrestris* (tab. 6).

3.4.2.2. Deuxième série d'expériences

Lors de la seconde série d'expériences, les déplacements des reines de *B. t. dalmatinus* (n=10) et de *B. t. xanthopus* (n=10) sont influencés par les sécrétions céphaliques (tab. 7 ,8, 10 et 11).

Lorsqu'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* deux sécrétions céphaliques de sa propre sous-espèce, ces reines sont observées un même nombre de fois sur chacune des deux zones: elles passent donc 50% de leur temps sur chacune de ces deux zones. Mais lorsqu'on

présente aux reines de *B. t. xanthopus* deux sécrétions céphaliques de la même sous-espèce, ces reines ne passent pas statistiquement 50% du temps sur chacune des deux zones. Ceci est probablement dû à des arrêts aléatoires devant l'une ou l'autre des deux sécrétions céphaliques, au faible nombre de répétitions et peut-être au contenu quantitativement différent des deux extraits.

A part cela, les reines vierges de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* passent significativement plus de temps (sont observées un plus grand nombre de fois) sur les zones à sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce (tab. 8 et 10). Cette observation est validée par l'analyse des déplacements: les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* se meuvent principalement dans la zone à sécrétion céphalique consubspécifique (fig. 21, fig. 22, fig. 23, fig. 24, fig. 28, fig. 29, fig. 30, fig. 31 et fig. 32). Une analyse du comportement individuel des dix reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* sélectionnées montre, à nouveau, qu'un plus grand nombre d'entre elles passent le plus de temps sur la zone à sécrétions céphaliques du mâle de leur propre sous-espèce (fig. 26 et 33).

Lorsque les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* sont en présence de deux sécrétions céphaliques de mâles de leur propre sous-espèce, elles s'immobilisent rarement. Dans les autres cas, les reines s'immobilisent parfois devant une des sécrétions céphaliques et n'en bougent plus. Les reines de *B. t. dalmatinus* le font alors rapidement (entre 25 et 40 secondes), les reines de *B. t. xanthopus* lentement (entre 123 et 300 secondes). Lorsque les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* ont le choix entre des sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de *B. t. sassaricus*, un plus grand nombre de reines s'immobilisent devant la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce. Lorsqu'elles sont en présence de sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques et de mâles de *B. t. canariensis* ou de *B. ignitus*, la majorité des reines reste en perpétuel mouvement. Les reines vierges de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* mettent plus ou moins autant de temps pour s'arrêter: les reines de *B. t. dalmatinus* s'immobilisent devant la sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce après 35 sec. minimum et 130 sec. maximum; les reines de *B. t. xanthopus* s'immobilisent devant la sécrétion céphalique consubspécifiques après 35 sec. minimum et 123 sec. maximum. Le laps de temps (médian) mis pour s'immobiliser devant une des sécrétions céphaliques (consubspécifiques ou non), autrement dit mis pour choisir une des sécrétions céphaliques, se situe entre 25 et 300 secondes. Le temps d'observation (300 secondes) est donc suffisant (tab. 9 et 12).

En présence des sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. sassaricus*, les reines de *B. t. dalmatinus* partagent leurs temps de manière égale entre les deux zones occupées par ces deux sécrétions céphaliques différentes (tab. 8). Les reines se déplacent principalement tant dans la zone à sécrétion céphalique de *B. t. sassaricus* (24,4% des déplacements totaux) que dans celle de *B. t. dalmatinus* (27,8% des déplacements totaux) (fig. 23). Par contre, si on observe plus en détail le comportement individuel des reines, un plus grand nombre d'entre elles passent le plus de temps sur la zone à sécrétion céphalique du

mâle de leur propre sous-espèce (fig. 26) et même s'y arrêtent (tab. 9). Rappelons, que lors de la première série d'expériences, les mâles de *B. t. dalmatinus* sont préférés aux mâles de *B. t. sassaricus* par les reines vierges de *B. t. dalmatinus* (tab. 6). Il serait sans doute souhaitable de réaliser plus de dix répétitions de chaque type d'expérience afin que le comportement anormal de certains spécimens soit "dilué dans la masse de données".

Pour toutes ces analyses, on rencontre une autre exception. Face à des sécrétions céphaliques de *B. ignitus*, les reines de *B. t. dalmatinus* ainsi que celles de *B. t. xanthopus,* ne passent pas plus de temps sur les zones à sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce (tab. 8 et 11). Pour les reines de *B. t. dalmatinus,* cette observation est renforcée par l'analyse des déplacements: l'ensemble des dix reines visite plus souvent la zone témoin et la zone à sécrétion céphalique du mâle de *B. ignitus* plutôt que la zone à sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (fig. 25). En analysant le comportement individuel des reines, on remarque qu'un même nombre d'entre elles visitent le plus souvent la zone témoin et la zone à sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (fig. 26). Tant pour les reines de *B. t. dalmatinus* que pour celles de *B. t. xanthopus*, l'analyse du comportement individuel démontre que la majorité des reines sont en perpétuel mouvement lorsqu'elles sont en présence de la sécrétion céphalique de *B. ignitus* (tab. 9 et 12). Les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* pourraient avoir un comportement d'alarme en présence de *B. ignitus*, ce qui se traduirait par cette agitation inhabituelle.

Un autre cas particulier survient lorsqu'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* des sécrétions céphaliques de *B. t. canariensis*. Selon l'analyse individuelle des reines, il semble, que tout comme les sécrétions céphaliques de *B. ignitus*, celles de *B. t. canariensis* ont un effet d'alarme. La majorité des reines reste en perpétuelle agitation (tab. 9 et 12).. Cependant, contrairement au cas *B. ignitus*, l'analyse globale des dix reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques consubspécifiques et de *B. t. canariensis* montrent que les reines préfèrent significativement la zone à sécrétion céphalique du mâle de sa propre sous-espèce (tab. 8 et 11). Elles sont observées un plus grand nombre de fois dans cette zone. L'analyse des déplacements confirme cette observation: les déplacements effectués dans la zone à sécrétion céphalique consubspécifique sont les plus nombreux (fig. 24 et 31). De plus, l'analyse individuelle des dix reines de *B. t. dalmatinus* et des 10 reines de *B. t. xanthopus* montre qu'un plus grand nombre d'entre elles passent plus de temps sur la zone à sécrétion céphalique du mâle de leur propre sous-espèce (fig. 26 et 33). Toutefois, un faible nombre de reines se sont immobilisées devant la sécrétion céphalique consubspécifique après 35s pour les reines de *B. t. dalmatinus* et après 77,5 sec. pour les reines de *B. t. xanthopus* (tab. 9 et 12). Par conséquent, elles sont restées 265 sec. et 223 sec. sur cette zone. Ceci explique probablement le pourcentage élevé de temps passé (nombre d'observations) par l'ensemble des dix reines dans la zone à sécrétion céphalique consubspécifique.

3.4.2.3 Comparaison des résultats des deux séries

Les résultats obtenus avec deux protocoles légèrement différents, lors d'expériences où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques consubspécifiques et des sécrétions céphaliques de *B. t. sassaricus* ou de *B. t. canariensis*, sont plus ou moins identiques (tab. 5, 6, 7 et 8). L'ensemble des reines ne se déplace pas de manière aléatoire. Elles passent plus de temps sur la zone qui contient la sécrétion céphalique consubspécifique.

Une différence apparaît cependant entre les deux séries d'expérience où l'on présente aux reines de *B. t. dalmatinus* des sécrétions céphaliques de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. sassaricus*. Avec la première série d'expériences, les reines préfèrent très hautement significativement les sécrétions céphaliques de *B. t. dalmatinus* aux sécrétions céphaliques de *B. t. sassaricus* (tab. 6). Avec la seconde série d'expériences, le test est non significatif (tab. 8): les reines ne préfèrent pas les sécrétions céphaliques consubspécifiques aux sécrétions céphaliques de *B. t. sassaricus*. Ceci pourrait être une conséquence d'un nombre de répétitions plus petit (10 au lieu de 33).

4. Discussion

4.1. Olfactométrie en fonction de l'âge

Coppée (2005) a pu déterminer que les mâles âgés de moins d'un jour ne synthétisent pas de 2,3-dihydro-6-trans farnesol (DHF). Or celui-ci est supposé avoir un rôle important dans la reconnaissance spécifique (Svensson, 1979). A partir de l'âge de 1 jour jusque 15 jours, le DHF devient la molécule majeure. Ensuite, à partir de 20 jours, les sécrétions céphaliques perdent leur caractère spécifique. Cet âge est alors considéré comme l'âge critique chez les mâles de *B. terrestris*. Il est d'ailleurs considéré comme l'âge normal de la mort en conditions naturelles. En captivité, les mâles peuvent vivre plus longtemps. Dès l'âge de 25 jours, le DHF disparaît presque totalement de leurs sécrétions céphaliques. Les mâles sont alors considérés comme séniles.

Coppée (2005) regroupe les mâles de différents âges en quatre classes distinctes selon la composition des sécrétions céphaliques ainsi que sur leur mode de vie. La première classe comporte les mâles à l'émergence (moins de 1 jour). La deuxième classe d'âge regroupe les mâles de 1 à 7 jours. A ce stade, les mâles ne sortent pas du nid car ils sont encore incapables de voler. Ils y restent généralement de 2 à 7 jours. Ce laps de temps leur permet probablement de terminer leur développement morphologique (durcissement de la cuticule par exemple) et physiologique de sorte que leur production phéromonale soit optimale dès la sortie du nid (Ågren *et al.*, 1979). La troisième classe d'âge regroupe les mâles âgés de 5 à 25 jours. Pendant cette période, les mâles sont en période d'activité sexuelle. Ils sortent alors du nid. Enfin la dernière classe d'âge regroupe les mâles dits séniles, c'est-à-dire ceux âgés de plus de 25 jours (Coppée, 2005).

Les présents résultats éthologiques sont cohérents avec les analyses chimiques et les activités des mâles en pleine nature. Les sécrétions des mâles âgés de 7 à 15 jours sont préférées par les reines vierges plutôt que les mâles plus jeunes ou plus âgés, avec une préférence accrue envers les mâles de 10 jours. Ceci correspond à la troisième classe d'âge, établie par Coppée (2005), qui regroupe les mâles en pleine activité sexuelle et qui ont le DHF comme composé majeur.

4.2. Olfactométrie en fonction des sous-espèces

Deux hypothèses s'affrontent quant à la préférence intraspécifique des reines vierges envers les phéromones sexuelles. La première hypothèse veut que si deux populations sont très isolées géographiquement, il n'est pas utile d'avoir des systèmes de reconnaissance spécifique (phéromones sexuelles) très différents. Les différentes populations (sous-espèces) ne se rencontrent de toute façon pas. D'après Svensson (1980), les espèces dont les individus

ont une composition phéromonale proche sont isolées, entre autre, par leur aire de distribution ou l'écologie. Par contre, la composition phéromonale des espèces coexistante est très différente et on peut même observer des mâles de différentes espèces se partager des sites de marquages (Svensson, 1980).

Cette première hypothèse diffère de celle proposée par Vereecken *et al.* (2007). D'après lui, plus les populations sont éloignées géographiquement plus les compositions de leurs phéromones sexuelles diffèrent. La différence génétique de ces populations distantes affecte la composition chimique des phéromones sexuelles. On arrive alors à un isolement reproductif par non reconnaissance du signal d'accouplement. Autrement dit, l'isolement géographique des populations induit une différenciation génique qui semble stimuler l'évolution des signaux populationnels. Les composés principaux des phéromones sexuelles sont identiques entre les différentes populations mais leur quantité relative varie (Vereecken, 2007).

Vereecken *et al.* (2007) observent une corrélation positive entre les distances génétiques des populations de *Colletes cunicularius* (abeilles solitaires) femelles et les différences de leurs composés phéromonaux. Ceci confirme son hypothèse: des populations voisines sont génétiquement proches et leurs phéromones assez semblables. L'auteur observe aussi que les mâles de *C. cunicularius* sont capables de distinguer des échantillons d'odeurs phéromonales qui contiennent les mêmes composés principaux mais en quantité différentes.

Les mâles de *C. cunicularius* sont attirés par les phéromones sexuelles de femelles de populations exotiques. Habituellement, les individus reconnaissent et préfèrent les conjoints proches aux exotiques (par ex: Anderson, 1994; Boake, 2002; Wong *et al.*, 2004). Or les mâles de *C. cunicularius* préfèrent les types d'odeurs différents de ceux trouvés dans leur propre population. Vereecken *et al.* (2007) suggèrent deux explications à cela:

- *C. cunicularius* est une abeille solitaire grégaire qui recherche un conjoint dans un secteur restreint, à proximité des sites d'émergences. Les préférences pour les conjoints exotiques peuvent être innées et augmentent ainsi l'"outbreeding".
- Les mâles, par leur apprentissage, sélectionnent des odeurs phéromonales différentes de celles qu'ils ont déjà rencontrées lors de précédentes tentatives d'accouplements. Ce comportement s'expliquerait par le fait que les femelles soient monandres (ne s'accouple qu'avec un seul mâle) et qu'il existe, par conséquent, une forte concurrence entre mâles pour l'accès aux jeunes femelles émergées. En agissant de la sorte, ils augmenteraient leurs chances de rencontrer de jeunes femelles encore vierges.

Les présents résultats diffèrent de ceux de Vereecken *et al*. (2007) Lors de cette étude, les femelles se dirigent vers les sécrétions céphaliques des mâles consubspécifiques, non exotiques. Cela est probablement dû au fait que, à l'inverse de *C. cunicularius*, les bourdons sont des insectes eusociaux qui recherchent leurs conjoints le long de circuits de patrouilles éloignés du nid. Les mâles augmentent alors leur probabilité de trouver un conjoint. En effet, quand l'aire de reproduction est large et éloignée du nid, il y a plus de chance qu'une jeune

reine vierge non soeur la traverse et s'y arrête (Alcock *et al.*, 1978, Paxton, 2005). De plus, à l'inverse des abeilles solitaires, chez les bourdons, ce sont les reines vierges et elles seules qui viennent à la rencontre des mâles en se posant sur leurs marquages odorants (Djegham, 1991; Djegham *et al.,* 1994).

Le circuit de patrouilles, ou vol nuptial, favorise la rencontre entre mâles et femelles vierges conspécifiques. Leurs modalités sont spécifiques. Ils ont donc un rôle important dans le mécanisme d'isolement des espèces (Haas, 1949 1967; Svensson, 1980).

Si on se réfère à la première hypothèse, dévellopée au début de ce chapitre, selon laquelle deux populations distantes ont des phéromones proches: on s'attend, lors des expériences à ce que les reines vierges ne préfèrent pas un mâle de sa propre sous-espèce à un mâle d'une sous-espèce non voisine (par exemple *B. t. dalmatinus* et *B. t. xanthopus*). Or, on observe le résultat inverse: les reines vierges préfèrent les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce. L'hypothèse proposée par Vereecken *et al.*, (2007) selon laquelle plus les populations sont distantes géographiquement, plus leurs phéromones sont différentes, semble dès lors être la plus judicieuse. En effet, dans ce cas, les reines préfèreraient bien les mâles de leur propre sous-espèce. Les autres sous-espèces, distantes géographiquement, seraient assez différentes génétiquement pour émettre des phéromones sexuelles capables d'induire des réactions différentes chez les reines.

D'après Rasmont & Adamski, 1995, *B. t. sassaricus* de Sardaigne, n'a que très peu de possibilité d'hybridation avec d'autres sous-espèces. Elle peut uniquement rencontrer *B. t. xanthopus* à l'extrême nord de l'île. D'après la première hypothèse, si deux sous-espèces sont voisines alors leur SMRS sera suffisamment différent pour être différencié par les reines. Donc, dans ce cas, les reines de *B. t. xanthopus* ne devraient pas s'immobiliser devant les sécrétions céphaliques de *B. t. sassaricus*.

Au contraire, d'après l'hypothèse de Vereecken *et al.* (2007) plus deux espèces sont voisines, plus leurs différences génétiques sont faibles et par conséquent, plus leur SMRS est proche. D'après Widmer *et al.* (1998), les *B. t. sassaricus* de Sardaigne sont plus proches génétiquement de *B. t. xanthopus* de Corse (fig. 34). Donc, dans ce cas, lors des expériences, les reines de *B. t. xanthopus* devraient s'immobiliser devant les sécrétions céphaliques de mâles de *B. t. xanthopus* et de *B. t. sassaricus* (tab. 12).

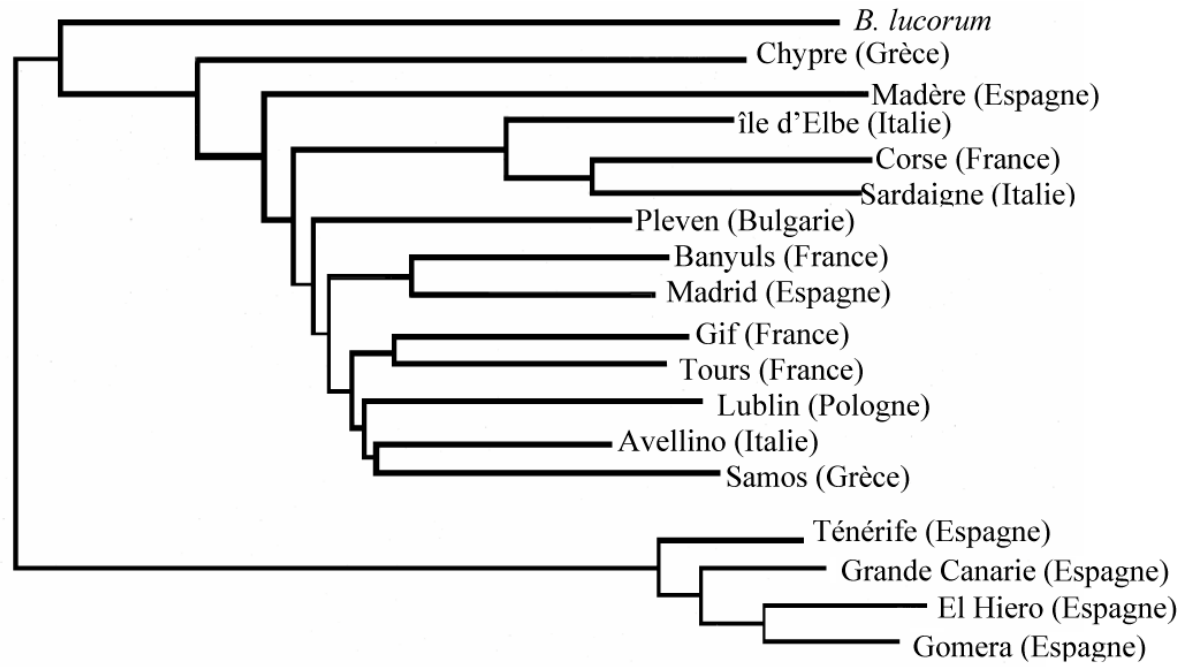

Figure 34, légende: **Figure 34. Phylogénie des différentes populations insulaires et continentales des *Bombus terrestris*.** Arbre *Neighbour-Joining* sur base des distances génétiques estimées sur 10 microsatellites (d'après Widmer *et al.*, 1998)**.** *B. t. xanthopus* en Corse*; B. t. sassaricus* en Sardaigne*; B. t. canariensis* à Ténérife, Grande Canarie, El Hiero et Gomera.

La deuxième hypothèse semble être la plus adéquate. En effet, lors des expériences, 4 reines s'immobilisent devant la sécrétion de *B. t. xanthopus* et 4 devant celle de *B. t. sassaricus* (tab. 12). Cependant, lorsqu'elles ont le choix, elles préfèrent les mâles de leur propre sous-espèce (fig. 33). Au contraire, quand des reines de *B. t. xanthopus* sont face à des sécrétions céphaliques de mâles de *B. t. xanthopus* et de mâles qu'elles ne peuvent pas rencontrer dans la nature, par exemple *B. t. dalmatinus*, 4 reines s'immobilisent devant la sécrétion céphalique de sa propre sous-espèce et une seule s'immobilise devant l'autre sécrétion céphalique (tab. 12). Il est à noter que Rasmont & Adamski (1995) observent des individus intermédiaires très rares entre *B. t. xanthopus* et *B. t. sassaricus* au sud de la Corse.

De même, les sous-espèces *terrestris* et *xanthopus* coexistent sur l'île d'Elbe et s'y hybrident (Rasmont & Quaranta, 1997). Par des études d'hybridations croisées entre *terrestris* et *xanthopus*, De Jonghe (1986a, 1986b) conclut à une interfertilité totale entre ces deux sous-espèces. Pourtant, la longue isolation de la Corse a conduit à une divergence, morphologique, enzymologique, mais aussi à des levées de diapause différentes (Krüger, 1951, Rasmont & Adamski, 1995) entre les populations corses et celles continentales. Selon Mayr (1963), quand deux taxons inter fertiles viennent en contact, ils ont deux possibilités: soit s'hybrider, soit sélectionner progressivement des mécanismes d'isolement.

Selon Dobzhansky (1970 cité par Paterson, 1985), les espèces constituent un système de populations; l'échange génétique entre ces populations est limité ou est empêché par un mécanisme d'isolement reproductif ou peut-être par une combinaison de plusieurs de ces mécanismes.

D'après Svensson (1980) et Terzo *et al.* (2003), il semble que les espèces sœurs évitent l'hybridation en sécrétant des phéromones sexuelles dont les molécules majeures sont radicalement différentes.

Coppée (2006) émet l'hypothèse qu'il puisse y avoir un isolement dû à la distance chez les *B. terrestris*. Chaque population est capable de s'hybrider avec celles qui la jouxtent, mais pas avec les populations plus éloignées (comme dans le cas célèbre du Goéland argenté, Rensch, 1933, Stresemenn & Timofeeff-Ressovsky, 1947). Ce phénomène peut s'expliquer par de petites variations interpopulationnelles de SMRS (couleur du plumage) qui ne permettent plus la reconnaissance spécifique entre individus de populations éloignées.

Estoup (1996) a étudié la différenciation génétique chez *B. terrestris* (huit populations du continent européen, six des îles méditerranéennes et une de Tenerife). Aucune différenciation significative n'a été trouvée parmi les populations de *B. terrestris* du continent européen. En revanche, les populations d'îles différaient toutes de manière significative et la plupart d'entre elles différaient des populations continentales (Estoup *et al.*, 1996, Widmer *et al.,* 1998, Shao *et al.,* 2004).

L'étude de Coppée (2006), sur la variabilité de la composition chimique des sécrétions céphaliques de *B. t. ter.*, *B. t. lusitanicus*, *B. t. sassaricus* et *B. t. dalmatinus*, montrent qu'il existe une variabilité dans l'abondance relative du 2,3-dihydro-6-trans farnesol. Ce dernier est néanmoins considéré comme la molécule majeure de l'espèce pour ces 4 taxons. Certaines molécules sont communes à 2, 3 voire aux 4 taxons, alors que d'autres molécules sont caractéristiques d'un seul taxon. Les composés moyens (<5%) sont présents dans les 4 taxons. Les différences les plus importantes se retrouvent au niveau des composés mineurs (<1%) (Coppée, 2006). Une étude statistique des différentes molécules trouvées dans ces 4 taxons montre qu'ils appartiennent à la même espèce, *B. terrestris*. Ils possèdent tous le DHF comme molécule majeure. Cependant, leurs sécrétions des glandes labiales céphaliques sont suffisamment différentes pour pouvoir être distinguées statistiquement. Coppée (2006) dit que "*La variation chimique des sécrétions céphaliques de ces 4 taxons traduit probablement la distance géographique et génétique, qui les séparent*".

Les présents résultats éthologiques démontrent bien cette variation. En effet, le SMRS des mâles de *B. t. terrestris*, *B. t. lusitanicus*, *B. t. sassaricus*, de *B. t. canariensis*, de *B. t. xanthopus* et de *B. t. dalmatinus* sont suffisamment différents pour que les reines vierges de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* perçoivent les sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce.

Les signaux sexuels sont en général spécifiques. D'après Mayr (1963), c'est cela qui constitue les mécanismes d'isolement assurant l'intégrité des espèces. Dans ce cas, lors de l'expérience témoin, où l'on observe la réaction des reines de *B. t. dalmatinus* face aux sécrétions céphaliques consubspécifiques et de *B. ignitus*, les reines devraient se diriger de préférence vers la sécrétion du mâle de son espèce plutôt que vers *B. ignitus*. Or, c'est le résultat contraire que l'on observe.

D'après Leroy (1987), il arrive que la spécificité des signaux ne soit pas absolue, et que les signaux chimiques d'individus d'espèces voisines soient assez proches pour que l'attraction sexuelle ne soit pas sélective. Dans la nature, de tels faits sont le plus souvent sans grande conséquence. D'autres facteurs assurent l'isolement des espèces: des répartitions géographiques et saisonnières différentes, des horaires de l'activité sexuelle décalés, des lieux de rencontre des partenaires sexuels différents (Leroy, 1987).

Des expériences d'attraction croisée démontrent que les femelles d'*Antheraea polyphemus* (papillons saturnides) n'attirent jamais les mâles de trois autres espèces (*Samia cynthia*, *Hyalophora cecropia, Callosamia prometha)* (Leroy, 1987). De même, les femelles de ces trois espèces n'attirent jamais les mâles d'*Antheraea polyphemus*. Par contre, Leroy (1987) cite *"[…], les femelles de* Samia cynthia *attirent les mâles de* Hyalophora cecropia […] *lorsqu'il n'y a pas simultanément d'attraction de la part de femelles de leur propre espèce,* […]". Entre 1962 et 1966, Scheideer (cité par Leroy, 1987) reprend l'étude de l'interattraction chez ces espèces et quelques autres. En réalisant des électro-antennogrammes, il prouve que les espèces d'un même genre tendent à répondre de manière identique à la phéromone de leur propre espèce et à celles des espèces très voisines (Leroy, 1987). Cette observation pourrait expliquer pourquoi les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanhopus* ne semblent pas préférer les sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques à celles de mâles de *B. ignitus* (une autre espèce du même sous-genre). Leroy (1987) cite "*Les phéromones des espèces voisines ont vraisemblablement des structures chimiques assez proches, ce qui expliquerait les interattractions entre ces espèces. Mais cette interprétation va à l'encontre de celle des néo-Darwiniens qui suggèrent, à l'inverse, que plus deux espèces sont voisines plus leurs signaux d'appel sexuel ont tendance à être différents les uns des autres*".

B. ignitus appartient au même sous-genre que *B. t. terrestris* mais les deux espèces sont très différentes. Kawakita *et al.* (2003, 2004), Hines *et al.* (2006) et Cameron *et al.* (2007) les présentent comme phylogénétiquement éloignées. *B. ignitus* aurait divergé beaucoup plus tôt que *B. terrestris* (Shao *et al.*, 2002). D'après Hines & Cameron (com. pers.), elles auraient divergé depuis 6 millions d'années (fig. 35).

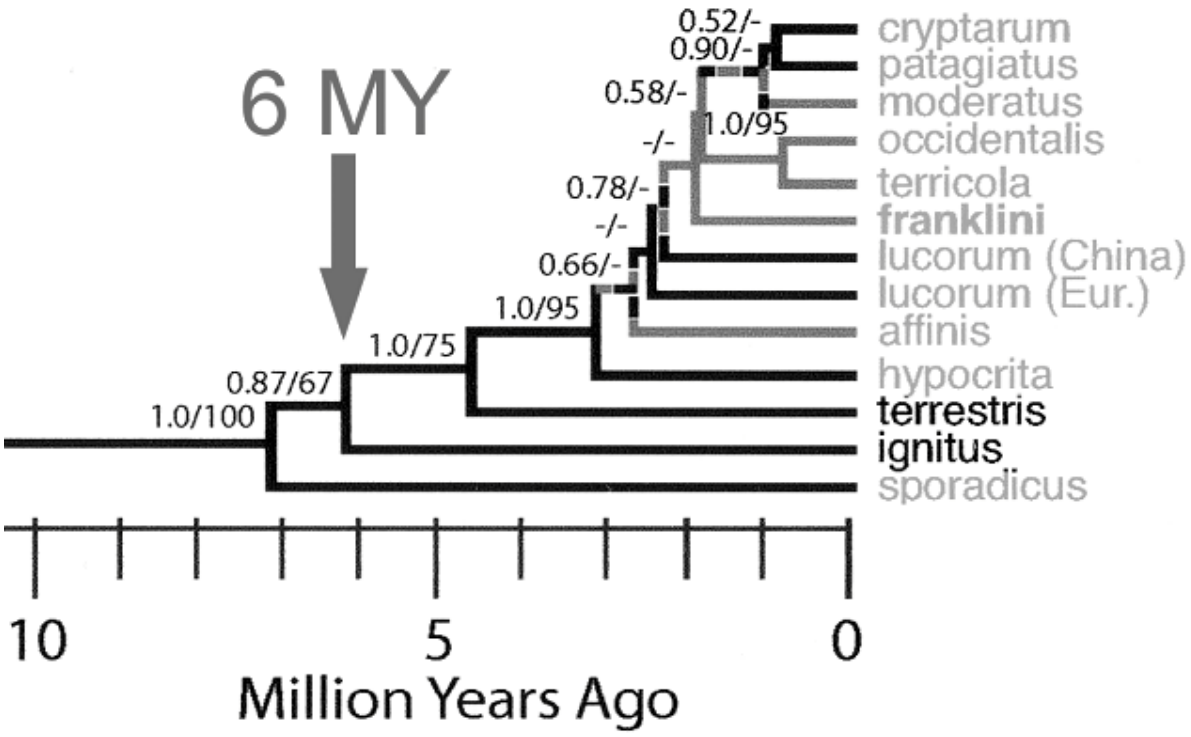

Figure 35. Phylogénie des différentes espèces du genre Bombus (d'après Hines & Cameron, com. pers).

Une autre explication au cas "*dalmatinus-ignitus"* peut être fournie. Les reines de *B. t. dalmatinus* pourraient avoir un comportement d'alarme vis-à-vis des sécrétions de *B. ignitus*. Elles sont en continuels mouvements et se dirigent le plus souvent vers la sécrétion de *B. ignitus*. Aucune reine n'est immobile, comme lorsqu'elle est en attente du mâle (arrêt total). Cette observation est également rapportée par Ono (1997, cité par Winter *et al.*, 2006). Il observe que les reines de *B. terrestris* ont un comportement agressif envers les reines de *B. ignitus* qui se trouvent à proximité. Il serait possible de quantifier l'orientation du déplacement des reines face aux sécrétions céphaliques de *B. ignitus* afin de savoir si ces sécrétions ont un effet répulsif sur les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus*. (fig. 36, Cammaerts, 1972)

La même hypothèse pourrait être émise pour expliquer le comportement, en continuel mouvement dans l'arène expérimentale, des reines de *B. t. dalmatinus* et *B. t. xanthopus* en présence des sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. canariensis*. Il se pourrait aussi que les sécrétions céphaliques de *B. t. canariensis* tout comme pour *B. ignitus* aient un effet d'alarme sur les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus*. Les présents résultats coïncident avec les résultats d'électroantennographie obtenus par Gorez (2007). L'électroantennographie consiste à relever une différence de potentiel entre les antennes lorsqu'on les vaporise avec un bouquet phéromonal. Gorez observe une plus grande différence de potentiel entre les antennes d'une reine de *B. t. dalmatinus* lorsqu'elle est vaporisée par une sécrétion céphalique de *B. t. canariensis* (dans 7 cas sur 12) plutôt que lorsqu'elle est vaporisée par une sécrétion céphalique de *B. t. dalmatinus*. Les reines de *B. t. dalmatinus* réagissent donc plus fort aux sécrétions de *B. t. canariensis* qu'aux sécrétions de mâles de leur propre sous-espèce.

L'hypothèse sur l'effet d'alarme de *B. t. canariensis* envers les reines de *B. t. dalmatinus* semble donc cohérente.

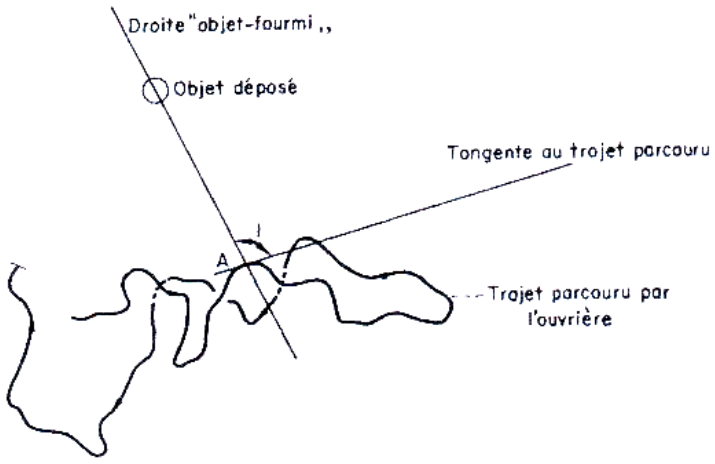

Figure 36. Mesure de l'orientation d'une ouvrière de *Mirmica rubra* par rapport à un objet déposé sur son aire de récolte. L'orientation de l'ouvrière est mesurée par la moyenne des angles A, mesurés après chaque X centimètre de parcours (0,5cm), entre la droite "objet-fourmi" et la tangente au trajet suivi. La moyenne des angles mesurés indique un effet attractif (moyenne < 90°), répulsif (moyenne >90°) ou neutre (moyenne ≈ 90°) de la source odorante sur le sujet étudié. (d'après Cammaerts, 1972).

La question du statut spécifique ou subspécifique de *B. t. canariensis* se pose alors. Cette question se pose d'ailleurs depuis longtemps. Initialement décrite comme une variété de couleur de *B. terrestris* (du continent européen), puis comme une espèce à part entière (Erlansson 1979 et Rasmont, 1983) elle est ensuite considérée par Rasmont *et al.* (1986), Rasmont (1988) et Hohmann *et al.,* 1993 comme une sous-espèce de *B. terrestris.* En 1996, Estoup *et al.*, d'après des études génétiques, émettent aussi des doutes sur le statut d'espèce du *canariensis*. Pourtant Widmer *et al.* (1998) montrent que toutes les autres sous-espèces de *B. terrestris* sont plus proches génétiquement de *B. lucorum* que de *canariensis* (fig. 34).

Lors des différentes expériences, certaines reines ont eu un comportement inhabituel. Celles-ci ne semblent préférer aucune des deux sécrétions céphaliques présentées et restent quasiment immobiles dès leur libération dans l'arène. Les dissections effectuées à posteriori sur ces reines ont montré que plusieurs de ces résultats paradoxaux s'expliquaient par un état de maturité des reines inadéquat. Sur les 17 spécimens écartés, 2 se sont avérés être des reines fécondées (ovarioles très développées et spermathèque blanche, Alford, 1975). Comme Sinkevich (2006) l'a montré lors de ses expériences éthologiques, les reines fécondées fuient les sécrétions céphaliques des mâles. Ensuite, 6 spécimens écartés se sont avérés être de grosses ouvrières (ovarioles non développées, spermathèque transparente, Alford, 1975).

Enfin, un des spécimens écartés était une reine vierge (ovarioles peu développées et spermathèque transparente, Alford, 1975). D'après Krieger *et al.* (2006), les reines ont un âge optimal d'activité sexuelle (6 jours après leur émergence). L'immaturité sexuelle de cette reine pourrait expliquer le comportement inhabituel face aux sécrétions céphalique des mâles.

D'après Wyatt (2003), les composés volatils attirent à distance les femelles tandis que les composés non volatils ont un rôle arrêtant ou agissent comme des composés de contact. Ces derniers, lorsqu'ils sont palpés par les antennes des reines, véhiculent des informations complémentaires sur les mâles qui les ont déposés (Djegham, 1991; Sinkevich, 2006). Les résultats ne semblent pas confirmer cette hypothèse. Certaines reines se sont immobilisées devant les sécrétions. Pourtant, elles ne peuvent entrer en contact avec les sécrétions céphaliques à cause du treillis circulaire placé dans l'arène expérimentale. Deux explications peuvent être apportées. Les reines ne sont pas assez éloignées de la source d'odeur. De ce fait, les composés dits de contact sont malgré tout perçus par les antennes des reines car ils sont suffisamment volatiles. Il se pourrait aussi que le treillis augmente l'effet arrêtant. Celui-ci offre aux reines un support vertical qui favorise une position d'arrêt.

D'après Djegham *et al.* (1994), les phéromones de marquages des mâles ont une action attractive et arrêtante sur les reines. Quand les reines inspectent les marquages, les mâles semblent être attirés par elles et essayent de se reproduire. L'odeur des reines semble être importante pour obtenir des tentatives d'accouplements de la part des mâles. D'après Djegham (1991), la faible acuité visuelle des bourdons est corrigée par les stimuli olfactifs (odeur phéromonale) qui permettent de reconnaître le bon conjoint. Les phéromones sexuelles de la femelle sont produites au niveau de la glande mandibulaire. Les phéromones mâles et femelles ont donc toutes deux un rôle important pour l'accouplement. Djegham *et al.* (1994) citent "*Ainsi les phéromones sexuelles, en plus de leur rôle attractif et de reconnaissance spécifique, semblent avoir un effet contextuel et agir comme une substance aphrodisiaque* ".

5. Conclusion

5.1 Préférence des femelles envers les mâles de différents âges

Les reines vierges préfèrent les sécrétions des mâles âgés de 7 à 15 jours avec une préférence accrue envers les mâles âgés de 10 jours. Ceci correspond à la classe d'âge chez laquelle le 2,3-dihydro-6-trans farnesol est le composé majeur.

5.2 Préférence des femelles envers les mâles de différentes sous-espèces

Les résultats de la première série d'expériences prouvent que l'ensemble des reines vierges de *B. t. dalmatinus* étudiées passe plus de temps sur les zones à sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce lorsque celles-ci sont confrontées aux sécrétions céphaliques des mâles des sous-espèces *sassaricus*, *canariensis*, *lusitanicus*, *terrestris.*

Les résultats de la seconde série d'expériences prouvent également que l'ensemble des reines vierges de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* passe plus de temps sur les zones à sécrétions céphaliques des mâles de leur propre sous-espèce que sur les zones à sécrétions céphaliques de mâles des sous-espèces différentes. Les suivis de déplacements indiquent que les reines se dirigent de préférence vers les sécrétions céphaliques consubspécifiques. Lorsqu'on analyse individuellement le comportement des reines, un plus grand nombre de reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* ont passé le plus de temps sur les zones à sécrétions céphaliques de mâles consubspécifiques. Un plus grand nombre d'entre elles se sont immobilisées devant les sécrétions céphaliques des mâles consubspécifiques plutôt que sur les sécrétions céphaliques des mâles de *B. t. sassaricus* et de *B. t. dalmatinus* ou *B. t. xanthopus*.

On observe cependant, une exception notable: les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* ne semblent pas préférer les sécrétions des mâles consubspécifiques à celles des mâles de *B. ignitus.* De plus, lorsque les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus* sont en présence de sécrétions céphaliques consubspécifiques et de *B. t. canariensis* ou de *B. ignitus,* la majorité des reines sont en perpétuel mouvement. D'après leur comportement, il semble que ces deux taxons ont un effet d'alarme sur les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. xanthopus*.

Les dissections post-expérimentales permettent d'élucider les cas douteux. Les reines fécondées, les grosses ouvrières et les reines immatures ou trop vieilles semblent avoir un comportement inhabituel face aux sécrétions céphaliques des mâles.

6. Perspectives

Le travail réalisé dans cette étude, s'opère à l'intérieur d'une arène expérimentale occupée successivement par différentes reines de deux sous-espèces de *B. terrestris* mises en présence de différentes sécrétions céphaliques de mâles de bourdons. L'intérêt de l'étude réside dans l'observation et l'analyse des déplacements (positions occupées au cours du temps) des reines par rapport aux sécrétions céphaliques mises en présence. Les sécrétions céphaliques contiennent probablement des composés volatils aux pouvoirs attractifs sur les reines, ainsi que des composés moins volatils aux effets arrêtant sur les reines. Cette recherche tente à éliminer l'effet arrêtant des sécrétions céphaliques: un dispositif est mis en place pour empêcher les reines d'être en contact avec les molécules peu volatiles, dites de contact. Il serait intéressant de mettre au point un protocole qui maximiserait, au contraire, l'effet arrêtant. Ceci pourrait être réalisé en utilisant une arène très petite dans laquelle les reines percevraient en même temps deux sécrétions arrêtantes et pourraient choisir entre les deux.

Enfin, après avoir étudié le comportement des reines vierges en présence de la phéromone complète, il sera intéressant d'identifier et de préciser l'attractivité de chacun des composés isolés.

7. Références

Ågren L., B. Cederberg & Bo G. Svensson, 1979. Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae). *Zoon,* **7**: 1-14.

Alcock J., E.M. Barrows, G. Gordh, L.J. Hubbard, L. Kirkendall, D.W. Pyle, T.L. Ponder & F.G. Zalow, 1978. The ecology and evolution of male reproductive behaviour in the bees and wasps. *Zoological Journal of Linnean Society*, **4**(64): 293-326.

Alford D.V., 1975. *Bumblebees.* Davis-Poynter, London, 352 p.

Anderson M., 1994. *Sexual selection. Monographs in behaviour and ecology*. Princeton University Press, USA, 624 p.

Békésy G. von, 1964. Olfactory analogue to directional hearing, *Journal Applied Physiology,* **19**: 369-373

Bergman P., 1997. *Chemical communication in bumblebee premating bahaviour.* Ph-D Thesis, Department of chemical Ecology. Göteborg University, Göteborg. 30 p + 6 annexes.

Bergström G., 1981. Chemical aspects of insect exocrine signals as a means for systematic and phylogenetic discussions in aculeate Hymenoptera. *Entomologica scandinavica*, suppl. **15**: 173-184.

Bergström G., Bo G. Svensson, M. Appelgren & I. Groth, 1981. Complexity of bumble bee marking pheromones: biochemical, ecological and systematical interpretations. *Systematics Association,* special volume, **19**: 175-183.

Boake C.R.B., 2002. Sexual signalling and speciation, a microevolutionary perspective. *Genetica* **116**: 205-214.

Cammaerts-Tricot M.C., 1972. Phéromones agrégeant les ouvrières de Myrmica Rubra. *Insect Physiology,* **19**: 1299-1315.

Cameron S.A, H.M. Hines & P.H. Williams, 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bee (Bombus). *Biological Journal of the Linnean Society*, **91**: 161-188.

Coppée A., 2005. *Caractérisation des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de* Bombus terrestris *(L.) (Hymenoptera, Apidae) en fonction de l'âge.* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 50 p.

Coppée A., 2006. *Caractérisation de la variabilité intraspécifique des sécrétions des glandes labiales céphaliques de* Bombus terretris (L.) (Hymenoptera, Apidae). Diplôme d'études approfondies, Université de Mons-Hainaut, Mons, 56 p.

De Jonghe R., 1986a. Crossing experiments with *Bombus terrestris* (L., 1758) and *Bombus terrestris xanthopus* Kriechbaumer 1870 and some notes on diapause and nosemose (Hymenoptera: Apoidea) *Phegea, Antwerpen,* **14**(1): 19-23.

De Jonghe R., 1986b. Male Parentage in a bumblebee: *Bombus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera:Apoidea). *Phega, Antwerpen,* **14**(2): 49-54.

Djegham Y, 1991. *Etude du comportement sexuel en captivité* de Bombus terrestris *auct. (Hymenoptera, Apidae).* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 63 p.

Djegham Y., J.-C. Verhaeghe & P. Rasmont, 1994. Copulation of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera:Apidae) in captivity. *Journal of Apicultural Research,* **33**(1): 15-20.

Dobzhansky T, 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York, 505 p.

Farkas S.R., H.H. & Shorey , 1972. Mechanisms of orientation to a distant pheromone sources, in pheromone, *Journal of Chemical Ecology*, **8**: 1207-1215.

Free J.B, 1970. Stimuli electing mating behaviour of bumblebee (*Bombus pratorum* (L.)) males. *Behaviour*, **40**(1-2): 55-61.

Free J.B & C.G Butler, 1959. *Bumblebees*. The Macmillan Company, New York, 208 pp.

Groth I., 1984. Male marking pheromones in North European Cuckoo Bumble Bee *Psithyrus* (Hymenoptera, Apidae). *Nova acta Regiae Societatis Scientiarium Upsaliensis*, Serie V, **3**: 161-166.

Goka K, 1998. Influence of invasive species on native species—will the European bumble bee, Bombus terrestris, bring genetic pollution into the Japanese native species? *Bulletin Biogeographical Society Japan,* **53**: 91–101.

Gorez M., 2007. *Electro-antennographie de reines vierges de* Bombus terrestris (*L.) (Hymenoptera, Apidae) vaporisées par des sécrétions céphaliques mâles*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 70 p.

Erlandsson S., 1979. *Bombus canariensis* Pérez 1895 n.stat & *Bombus maderensis* n.sp. from the Macronesian Islands. *Entomologia Scandinavia,* **10**: 1427-1431.

Estoup A., M. Solignac, J.M. Cornuet, J. Goudet & A. Scholl, 1996. Genetic differentiation of continental and island population of *Bombus terrestris* (Hymenopera Apidae) in Europe. *Molecular Ecology*, **5**: 19-31

Fraenkel G.S. & D.L. Gunn, 1940. *The orientation of animals.* Clarendon Press, Oxford.

Haas A., 1949. Arttypische Flugbahnen von Hummelmännchen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie,* **31**: 281-307.

Haas A., 1967. Vergleichende Verhaltensstudien zum Paarungsschwarm der Hummeln (*Bombus*). *Zeitschrift für Tierpsychologie, 257-277.*

Hines H, S. Cameron & P. Williams, 2006. Molecular phylogeny of the bumble bee subgenus *Pyrobombus.* (Hymenotera: Apidae: *Bombus*) with insights into gene utility for lower-level analysis. *Invertebrate systematics,* **20**: 289-303.

Hohmann H., F. La Roche, G. Ortega, & J. Barquin, 1993. *Bienen, Wespen und Ameisen der Kanarischen inseln (Insecta: Hymenoptera: Aculeata)*. Übersee-Museum, Bremen, 894 p.

Inari N. T. Nagamitsu, T. Kenta, K. Goka & T. Hiura, 2005. Spatial and temporal pattern of introduced *Bombus terrestris* abundance in Hokkaido, Japan, and its potential impact on native bumblebees. *The Society of Population Ecology and Spring-Verlag Tokyo,* **44**: 77-82.

Ings T. J. Schikora & L. Chittka, 2005. Bumblebees, humble pollinators or assiduous invaders? A population comparison of foraging performance in *Bombus terrestris*. *Behavioural ecology*, **144**: 508-516.

Karlson P, 1960. Pheromones *Ergebnisse der Biologie,* **22**: 212-225.

Karlson P. & A. Butenandt, 1959. Pheromones (ectopheromones) in insects *Annual Reviews Entomology.* **4**: 39–58.

Karlson, P. & M Lüscher, 1959. 'Pheromones': a New Term for a Class of Biologically active Substances. *Nature*, **153**: 55-56.

Kawakita A, T. Sota, J. Ascher, M. Ito & H. Tanaka, 2003. Evolution and phylogenetic of Alignment Gaps Within Intron sequence of Three Genes in Bumble Bees (*Bombus*). *Molecular biology evolution,* **20**(1): 87-92.

Kawakita A, T. Sota, M. Ito, J. Ascher, H. Tanaka, M. Kato & D. Roubik, 2004. Phylogeny, historical biogeography, and character evolution in bumble bee (*Bombus*: Apidae) based on simultaneous analysis of trhree nuclear gene sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, **31**: 799-804.

Krieger G., M-J. Duchateau, A. Van Doorn, F. Ibarra, W. Francke & M. Ayasse, 2006. Identification of quenn sex pheromone components of the bumblebee *Bombus terrestris. Journal of Chemical Ecology*, **32**(2): 453-471.

Krüger E.V., 1951. Über die Bahnflüge der Männchen der Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* (Bombidae, Hymenoptera). *Zeitschrift für Tierpsychologie,* **8**(1): 62-75.

Kullenberg B., G. Bergström, B. Bringer, B. Calberg & B. Cederberg, 1973. Observations on scent marking by *Bombus.* Latreille. and *Psithyrus* Lepeletier. males (Hymenoptera., Apidae) and localization of sites of production of the secretion. *Zoon*, Suppl, **1**: 23-29.

Leroy Y., 1987. *L'univers odorant de l'animal: les stimulations chimiques dans les communications et les comportements des animaux*. Société nouvelle des Edition Boubée, Paris, 375 p.

Masson C., C. Strambi, 1977. Sensory antennal organization in an ant and a wasp. *Journal Neurobiology,* **8**: 537-548.

Mayr E., 1963. *Animal species and evolution*. Belknap Press, Cambridge, 797 p.

Ono M., 1997. Ecological implications of introduced *Bombus terrestris*, and significance of domestication of Japanese native bumblebees (*Bombus* spp.). p. 244-252 in: *Proceedings, International Workshop Biological Invasions of Ecosystem by Pests and Beneficial Organisms.* National Institute of Agro-Environmental Sciences, Ministry of Agriculture, Forestry, Fisheries. Tsukuba, Japan.

Pain J., 1971. Phéromones et comportement chez quelques Hyménoptères. *Apidologie*, **2**(4): 319-334.

Passera L., S. Aron, 2005. *Les fourmis: comportement, organisation sociale et évolution.* Les Presses scientifiques du CNRC, Ottawa, 480 p.

Paterson H.E.H., 1985. The Recognition Concept of Species, Species and Speciation. *Transvaal Museum Monograph, Pretoria,* **4**: 21-29.

Paterson H. E. H., 1993. *Evolution and Regognition Concept of Species: Collected Writings*. J. Hopkins University Press, Baltimore, 234 p.

Paxton R., 2005. Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. *Apidologie, **36**: 145-156.*

Rasmont P., 1982. A propos des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Corse. *Bulletin de la société entomologique de Mulhouse*, **1982**: 49-61.

Rasmont P., 1983. Catalogue commenté des bourdons de la région ouest-paléarctique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Notes fauniques de Gembloux,* **7**: 1-72.

Rasmont P., 1988. *Monographie écologique et biogéographique des Bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae).* Thèse de doctorat, Faculté des Sciences agronomiques de l'Etat, Gembloux, Gembloux, 309 p.

Rasmont P. & A. Adamski, 1995. Les Bourdons de la Corse (Hymenoptera, Apoidea, Bombinae). *Notes fauniques de Gembloux,* **31**: 3-87.

Rasmont P. & M. Quaranta, 1997. I Bombi dell'Arcipelago Toscano (Hymenoptera Apidae). *Bollettino della Societá Entomolocia Italiana,* **129** (1): 31-38.

Rasmont P., A. Scholl, R. De Jonghe, E. Obrecht & A. Adamski 1986. Identité et variabilité des mâles de bourdons du genre *Bombus* Latreille sensu stricto en Europe Occidentale et Centrale (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Revue Suisse Zoology*, **93**(3): 661-682.

Rasmont P. & M. Terzo, in prep. *West-Palaearctic Bumblebees*. Apollo books.

Regnier F.E. & J H. Law, 1968. Insect pheromones. *Journal of Lipid Research,* **9**: 541-551.

Rensch B., 1933. Zoologische Systematik und Artbildungsprobleme. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Geselschaft Zoologister Anzeiger (*supplement) **6**: 19-83.

Shao Z, H. Mao, W. Fu & Y.-P. Zhang, 2002. Phylogenetic relationships of 11 bumblebee species (Hymenoptera: Apidae) based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Zoological Research* , **23**: 361–366.

Shao Z.Y., H.X. Mao, W.J Fu, M. Ono & D.S. Wang, 2004. Genetic strucuture of Asian Populations of *Bombus ignitus* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity, The American Genetic Association*, **95**(1): 46-52.

Siegel S. & N.J. Castellan,. 1988. *Non parametric statistics for the Behavioral Sciences*. Mcgraw-Hill International Editions, Statistics series, New-York, 399 p.

Sinkevich V., 2006. *Etude comportementale de l'attractivité du 2,3-dihydrofarnesol envers les femelles vierges de* Bombus terrestris *(L.) (Hymenoptera, Apidae).* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 51 p.

Svensson Bo G., 1979. Patrolling behaviour of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae) in a subalpine/alpine area, Swedish Lapland. *Zoon,* **7**: 67-94.

Svensson Bo G., 1980. Species isolating mechanisms in male Bumblebee (Hymenoptera, Apidae). *Abstract Uppsala Faculty of Sciences,* **549**: 1-42.

Terzo M., Urbanova K., Valterova I. & Rasmont P., 2005. Intra and interspecific variability of the cephalic labial gland's secretions in male bumble bee: the case of *Bombus* (*Thoracobombus.*) *ruderarius* (Müller) and *Bombus.* (*Thoracobombus.*) *sylvarum* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Apidologie* , **36**: 85-96.

Terzo M., I. Valterova, K. Urbanova & P. Rasmont, 2003. De la nécessité de redécrire les phéromones sexuelles des mâles de bourdons (Hymenoptera: Apidae, Bombini) publiées avant 1996 pour leur utilisation en analyse phylogénétique. *Conférence internationale francophone d'enthomologie-Montréal 2002 Biogéographie et phylogénie.Phytoprotection,* **84**: 39-49.

Stresemann E. & N. W. Timofeeff-Ressovsky, 1947 Artentstehung in geographischen Formenkreisen. I. Der Formenhreis Larus argentatus-cachinnans-fucus. *Biologischs Zentralblatt*, **66:** 57–76.

Velthuis H. H. W. & A. van Doorn. 2006. A century of advances in bumble bee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, **37**: 421-451.

Vereecken N., J. Mant & F. Schiestl, 2007. Population differentiation in female sex pheromone and male preference in a solitary bee. *Behavior Ecology Sociobiology,* **61**(11): 811-821

Widmer A, P. Schmid-Hempel, A. Estoup & A. Scholl, 1998. Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* S.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Island and Madeira. *Heredity,* **81**: 563-572.

Winter K., L. Adams, R. Thorp, D. Inouye, L. Day, J. Ascher & S. Buchmann, 2006. Importation of Non-Native Bumble Bees into North America: Potential Consequences of Using *Bombus terrestris* and Other Non-Native Bumble Bees for Greenhouse Crop Pollination in Canada, Mexico, and the United States. *North American Pollinator Protection Campaign (NAPPC),* 33 p.

Wong B., J.S Keogh & M.D. Jennions, 2004. Mate recognition in a freshwater fish: geographical distance, genetic differentiation and variation in female preference for local over foreign males. *Journal Evolution. Biology,* **17**: 701-708.

Wyatt D.T., 2003. *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste.* Cambridge University Press, Cambridge, 391 p.