

UNIVERSITE DE MONS- HAINAUT

-

FACULTE DES SCIENCES

-

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Caractérisation des sécrétions des glandes
labiales céphaliques des mâles de
Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae)
en fonction de l'âge**

Directeur de mémoire
Prof. Pierre Rasmont

Mémoire de fin d'Etudes
Présenté par **Audrey Coppée**
En vue de l'obtention du grade
de **Licenciée en Sciences
Biologiques.**

Année académique 2004-2005

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 tout particulièrement le Prof. Pierre Rasmont de m'avoir accueillie dans son service, pour ses conseils judicieux et sa constante attention.

Je remercie également le Dr. Michäel Terzo de m'avoir guidée tout au long de cette année, pour ses conseils avisés et sa disponibilité.

Je tiens à remercier le service de chimie organique du Prof. Robert Flammang pour m'avoir permis d'utiliser le GC-MS, et plus particulièrement le Dr. Pascale Wantiez et le Dr. Pascal Gerbaux pour leur aide et leur conseils.

Je remercie le Prof. Philippe Grosjean pour l'aide précieuse apportée dans le cadre des analyses statistiques.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à M. Ir. Denis Michez, Mme Stéphanie Iserbyt et Mme Olivia Ponchau pour leur aide et leur soutien constants, ainsi que M. Francis Delmarquette pour son aide technique.

Je n'oublie pas mes proches 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. Les phéromones	1
1.2. La production de phéromones sexuelles chez les bourdons	1
1.2.1. Généralités	1
1.2.2. Composition des sécrétions des glandes céphaliques labiales de <i>Bombus terrestris</i> (L).	4
1.3. Variabilité interspécifique	6
1.4. Variabilité intraspécifique	8
1.5. Variabilité journalière	10
1.6. Variabilité due à l'âge	10
1.7. Objectifs	12
2. Matériel et méthode	13
2.1. Matériel biologique	13
2.1.1. Conditions d'élevage de la colonie	13
2.1.2. Isolement des mâles	14
2.1.3. Détermination des classes d'âge	15
2.1.4. Détermination de la date de sacrifice	16
2.1.5. Condition d'élevage des mâles	16
2.1.6. Sacrifice des mâles	17
2.2. Dissection des glandes céphaliques labiales	17
2.2.1. Technique de dissection	17
2.2.2. Conservation des glandes	18
2.3. Analyse chimique	18
2.3.1. Technique du GC-MS	18
2.3.2. Tirage aléatoire	19
2.4. Analyse statistique	19
2.4.1. Constitution de la matrice	19
2.4.2. Analyse par classe d'âge	20
2.4.2.1. Analyse discriminante linéaire de 13 classes d'âge	20
2.4.2.2. Analyse discriminante linéaire de 4 classes d'âge	21
2.4.2.3. Méthode de classification hiérarchique	21
2.4.3. Analyse par individu	22
3. Résultats	23
3.1. Elevage	23
3.2 Injection au GC-MS	23
3.2.1. Chromatogrammes	23
3.2.2. Identification des composés	24
3.2.3. Analyses statistiques	27
3.2.3.1. Analyse discriminante linéaire	27
3.2.3.2. Classification hiérarchisée	31

3.2.3.3. Analyse en composantes principales.....	33
3.2.4. Tableau récapitulatif	36
4. Discussion	37
4.1. Chromatogrammes	37
4.2. Identification des composés	40
4.3. Distinction des classes	42
4.4. Comparaison des résultats avec les observations d'Ågren	43
4.5. Mise en place des voies métaboliques	44
4.6. Implications.....	44
5. Conclusions	46
5.1. Synthèse des composés	46
5.2. Variabilité avec l'âge	46
5.3. Voies métaboliques	46
6. Bibliographie.....	47
7. Annexes.....	49
Annexe 1	49
Annexe 2	50

1. Introduction

1.1. Les phéromones

Les phéromones sont des molécules de nature variable qui permettent une communication entre individus conspécifiques. Chez les Hyménoptères, elles sont synthétisées par de nombreuses glandes exocrines (glandes tarsales, mandibulaires, de Dufour, tergaux, glande à venin,...). Tous les aspects majeurs de la vie des insectes - le développement, l'alimentation, la nidification, l'accouplement, la défense, le recrutement - peuvent être influencés par des signaux chimiques exocrines (Bergström, 1981). Les phéromones sont extrêmement diversifiées, par leurs fonctions, par leur nature chimique et par les organes qui les produisent.

Ces signaux chimiques sont un moyen efficace de communiquer à plus ou moins courte distance. Ils semblent être particulièrement fréquents en ce qui concerne l'attraction sexuelle et la reconnaissance individuelle chez les Hyménoptères (Ayasse *et al.*, 2001).

1.2. La production de phéromones sexuelles chez les bourdons

1.2.1. Généralités

Les phéromones sexuelles sont des odeurs produites par un individu afin de stimuler une ou plusieurs réactions comportementales chez le sexe opposé susceptibles d'amener les individus à s'accoupler.

Chez les bourdons, ce sont les mâles qui produisent des phéromones sexuelles pour attirer les femelles. La composition de ces phéromones est spécifique (Calam, 1969; Terzo *et al.*, 2003). C'est le premier phénomène par lequel les individus peuvent retrouver un conjoint potentiel, il en existe 3 autres: la conjonction topographique, la synchronisation de la période de production des sexués et la morphologie compatible des genitalia (Svensson, 1979). Cette dernière caractéristique semble mineure (Rasmont, com.pers.).

D'après le concept de reconnaissance des espèces de Paterson, l'ensemble des individus susceptibles de se reconnaître comme conjoints potentiels constituent une espèce (SMRS: *Species Mating Recognition System*; Paterson, 1993). Le niveau auquel il faut se placer pour comprendre les limites de l'espèce est donc bien celui des individus en rendant compte de la variabilité de leur SMRS.

Les phéromones sexuelles sont produites par la partie céphalique des glandes labiales. Ce sont des glandes acineuses paires qui occupent la majeure partie du volume de la tête. Leurs sécrétions se déversent dans une bourse unique, où se rejoignent également les canaux excréteurs des glandes labiales thoraciques et des glandes salivaires. Cette bourse se poursuit par un long conduit unique qui rejoint la base de la langue (fig. 1.).

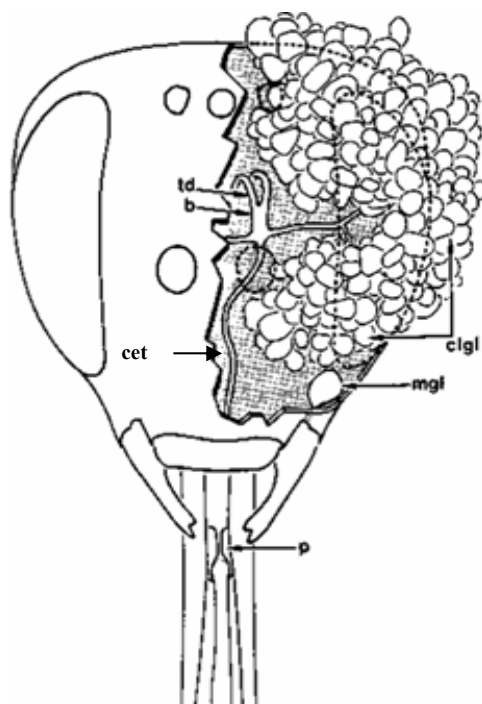


Figure 1. Dessin semidiagrammatique de la tête de *Bombus lapidarius* (L.) mâle, en vue frontale.

b : bourse ; **cet** : canal excréteur terminal ; **clgl** : glande céphalique labiale ; **mgl** : glande mandibulaire ; **p** : paraglosse ; **td** : conduits de la glande labiale thoracique. D'après Ågren *et al.* (1979).

Les molécules qui composent les sécrétions des glandes labiales céphaliques peuvent être des terpènes, des hydrocarbures aliphatiques et des longues chaînes de cétones, d'acétates, d'alcools ou d'aldéhydes aliphatiques (Terzo *et al.*, in. prep.).

Les phéromones sexuelles sont constituées par deux familles de molécules : les isoprénoïdes (aussi appelés mévalogénines ou terpénoïdes) et les dérivés d'acides gras. Les premiers dérivent du métabolisme de l'acide mévalogénique (fig. 2.).

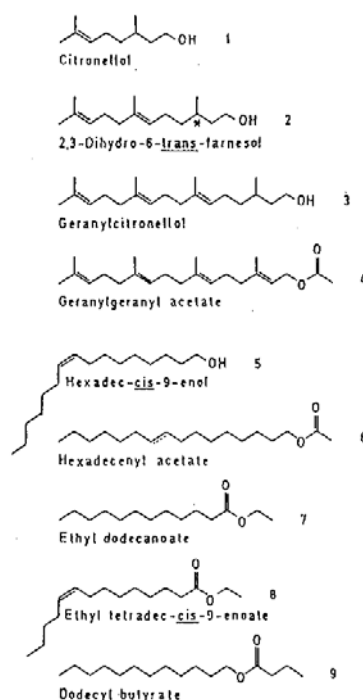


Figure 2. Exemples de molécules des glandes céphaliques labiales. 1-4 :terpénoïdes ; 5-9 :dérivés d'acide gras. D'après Bergström *et al.* (1981)

Pour déposer ses sécrétions, le mâle marque de manière active certains objets en les mordillant (Svensson, 1979) (fig. 3.).

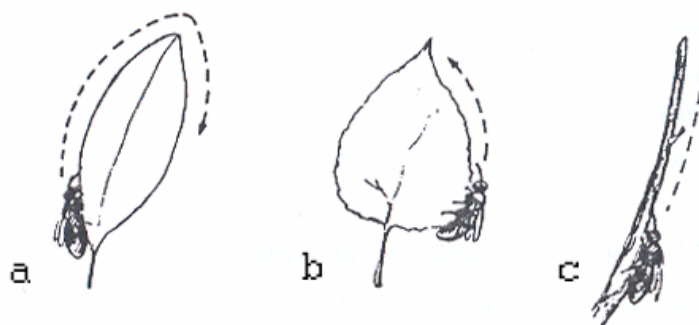


Figure 3. Comportement de marquage d'un mâle de *Bombus lapponicus* (Fabricius): (a) sur une feuille de *Salix glauca* L., (b) sur une feuille de *Betula tortuosa* L., et (c) sur une branche sèche de *Betula nana* L.. D'après Svensson (1979).

Les marques sont déposées par les mâles en différents points d'un circuit qu'ils patrouillent régulièrement (fig. 4.).

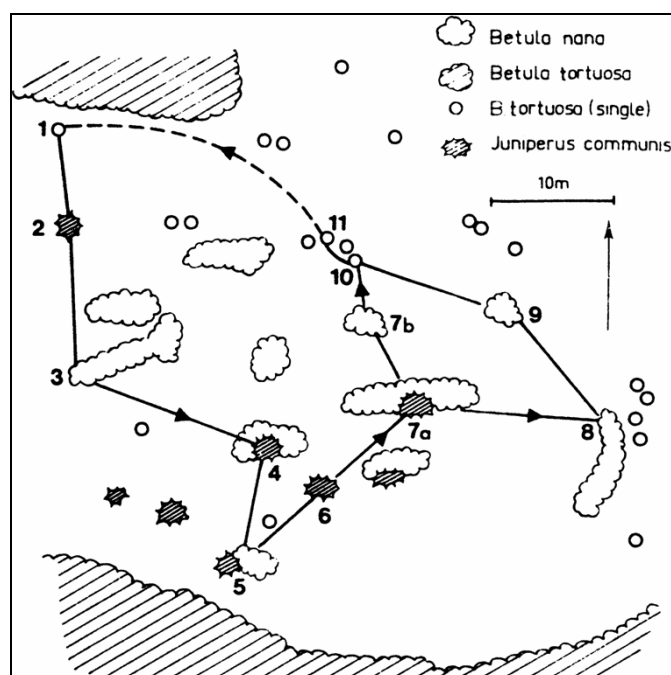


Figure 4. Circuit de patrouille (flèches) et de marquage (numéro 1-11) d'un mâle de *Bombus flavidus* Eversmann. D'après Cederberg *et al.* (1984).

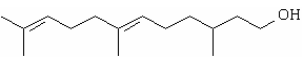
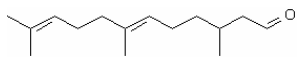
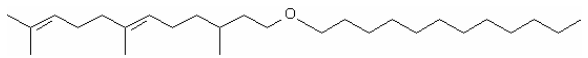
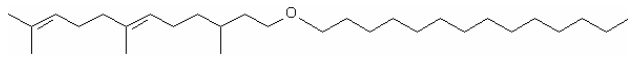
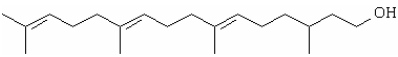
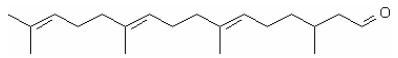
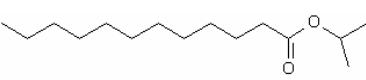
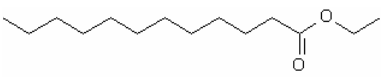
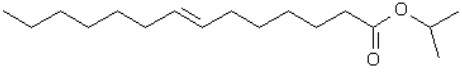
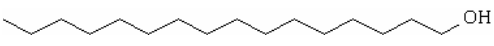
Kullenberg (1973) indique qu'au cours de sa toilette, le mâle peut étaler des sécrétions à la surface de son corps. Il parle dans ce cas d'un marquage passif. Le rôle de ce comportement pour la reconnaissance spécifique n'est pas connu.

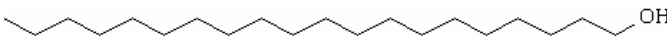
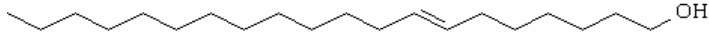
1.2.2. Composition des sécrétions des glandes céphaliques labiales de *Bombus terrestris* (L).

Bergman (1997) établit une liste de 23 molécules identifiées dans un extrait de glandes labiales céphaliques de *Bombus terrestris* (tab. 1.)

Tableau 1. Composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques de *Bombus terrestris*

D'après Bergman (1997)

		<u>Abondance relative</u>
<u>Isoprénoïdes :</u>		<u>moyenne en % (n=14):</u>
1.	2,3-dihydrofarnesol 	20,6
2.	2,3-dihydrofarnesal 	1,4
3.	2,3-dihydrofarnesyl dodecanoate 	7,0
4.	2,3-dihydrofarnesyl tetradecanoate 	2,4
5.	Geranylcitronellol 	14,9
6.	Geranylcitronellal 	0,6
<u>Dérivés d'acide gras :</u>		
7.	Isopropyl dodecanoate 	0,4
8.	Ethyl dodecanoate 	0,1
9.	Tetradecanol 	0,9
10.	Tetradecanal 	1,2
11.	Isopropyl tetradecenoate 	0,1
12.	Hexadecanol 	8,8

13.	Octadecadienol	3,8
		
14.	Octadecatrienol	3,2
		
15.	Eicosanol	1,6
		
16.	Eicosenol	6,5
		
17.	Docosenol	2,1
		
18.	Heneicosane	2,3
		
19.	Tricosane	9,2
		
20.	Tricosene	1,1
		
21.	Pentacosane	1,5
		
22.	Pentacosene	0,6
		
23.	Heptacosene	1,9
		

1.3. Variabilité interspécifique

Etant donné que les phéromones sexuelles sont un des moyens de reconnaissance spécifique, chaque spécimen de bourdons recherche un bouquet de phéromones spécifique. La part phéromonale des sécrétions n'est pas encore connue. Ces sécrétions présentent :

- quelques composés majeurs, présents en grande quantité,
- des composés mineurs présents en moindre quantité (surface du pic comprise entre 1 et 100%),
- de nombreux composés présents à l'état de traces (surface du pic < 1%).

Depuis de nombreuses années, l'analyse des sécrétions des glandes labiales céphaliques par la technique du GC-MS a permis de mettre en évidence les différences de composition qui existent entre les espèces. Bergström *et al.* (1981) dressent un tableau qui reprend les molécules de 18 espèces de bourdons appartenant à 3 groupes différents (fig. 5.), sur base des résultats de Bergström *et al.* (1967), Kullenberg *et al.* (1970), Bergström *et al.* (1973), Bergström & Svensson (1973 a, b), et Svensson & Bergström (1977,1979).

BOMBUS						PYROBOMBUS						ALPINOBOMBUS					
<i>B. lucorum</i> blonde	<i>B. lucorum</i> dark	<i>B. terrestris</i>	<i>B. spodiopiceus</i>	<i>B. pascuorum</i>	<i>B. lucorum</i> blonde	<i>P. cingulatus</i>	<i>P. hypnorum</i>	<i>P. jonellus</i>	<i>P. lapponicus</i>	<i>P. monticola</i>	<i>P. pratorum</i>	<i>P. sordidus</i>	<i>P. cullumanus</i>	<i>P. lapidarius</i>	<i>A. alpinus</i>	<i>A. polaris</i>	<i>A. hyperboreus</i>
1																	
2																	
3																	
4																	
5																	
6																	
7																	
8																	
9																	

MEVALOGENINS	
Geraniol	154
Citronellol	156
Geranyl acetate	196
Citronellyl acetate	198
Farnesene isomers	204
all-trans-Farnesol	222
2,3-Dihydro-6-trans-farnesol	224
2,3-Dihydro-6-trans-farnesal	222
all-trans-Farnesyl acetate	264
2,3-Dihydrofarnesyl acetate	266
Geranylgeraniol	290
Geranylcitronellol	292
Geranylgeranyl acetate	332
ACETOGENINS	
Dodecanol	186
Tetradecanol	214
Hexadecadienol	238
Hexadecenol	240
Hexadecanol	242
Octadecadienol	266
Octadecenol	268
Tetradecanal	212
Dodecyl acetate	228
Tetradecyl acetate	256
Hexadecenyl acetate	282
Hexadecyl acetate	284
Octadecyl acetate	312
Eicosenyl acetate	338
Eicosyl acetate	340
Docosyl acetate	368
Ethyl decanoate	200
Ethyl dodecanoate	228
Ethyl tetradecanoate	254
Ethyl tetradecanoate	256
Ethyl hexadecatrienoate	278
Ethyl hexadecadienoate	280
Ethyl hexadecenoate	282
Ethyl octadecatrienoate	306
Ethyl octadecadienoate	308
Ethyl octadecenoate	310
Ethyl octadecanoate	312
Dodecyl butyrate	256
Tetradecyl butyrate	284

Figure 5. Compositions des phéromones chez 18 espèces de bourdons. Les molécules majeures sont représentées par un carré, les moyennes par un triangle et les mineures par une croix. D'après Bergström *et al.* (1981).

Ce tableau montre clairement que lorsque les composés majeurs sont communs à plusieurs espèces, les composés mineurs déterminent une combinaison unique à l'espèce.

L'analyse de la fraction évaporée à partir des marques de 4 mâles d'espèces différentes (*Bombus pratorum* (L.), *B. terrestris* (L.), *B. lucorum* (L.) et *B. lapidarius* (L.)), démontre également qu'il existe une différence interspécifique de composition (fig. 6.).

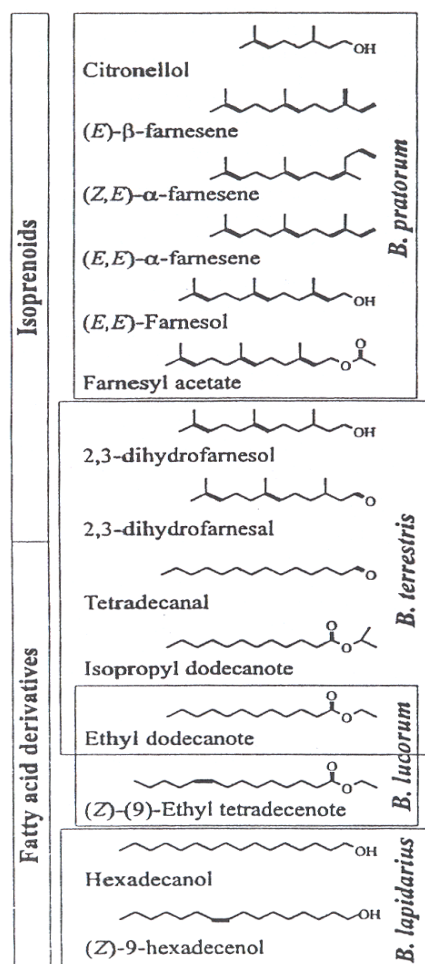


Figure 6. Fraction évaporée des sécrétions de 4 espèces de bourdons. D'après Bergman (1997).

1.4. Variabilité intraspécifique

Kullenberg *et al.* (1973) observent que l'abondance relative des mévalogénines et les proportions alcool- cétone et alcool- aldéhyde changent graduellement au cours de la saison.

Il existe également une variabilité individuelle mise en évidence récemment chez *Bombus ruderarius* (Müller) et *Bombus sylvarum* (L.) (Terzo *et al.*,2005). Une grande part de la variabilité de la composition des sécrétions labiales céphaliques de 22 mâles de *B. ruderarius* concerne le composé principal : le 9-hexadécénol. La surface

du pic de 9-hexadécénol d'un spécimen représentatif vaut 67% de la surface totale (fig. 7.). Ce composé majeur, apparemment indispensable à la reconnaissance spécifique disparaît pourtant presque totalement chez certains spécimens sans qu'on en comprenne la raison.

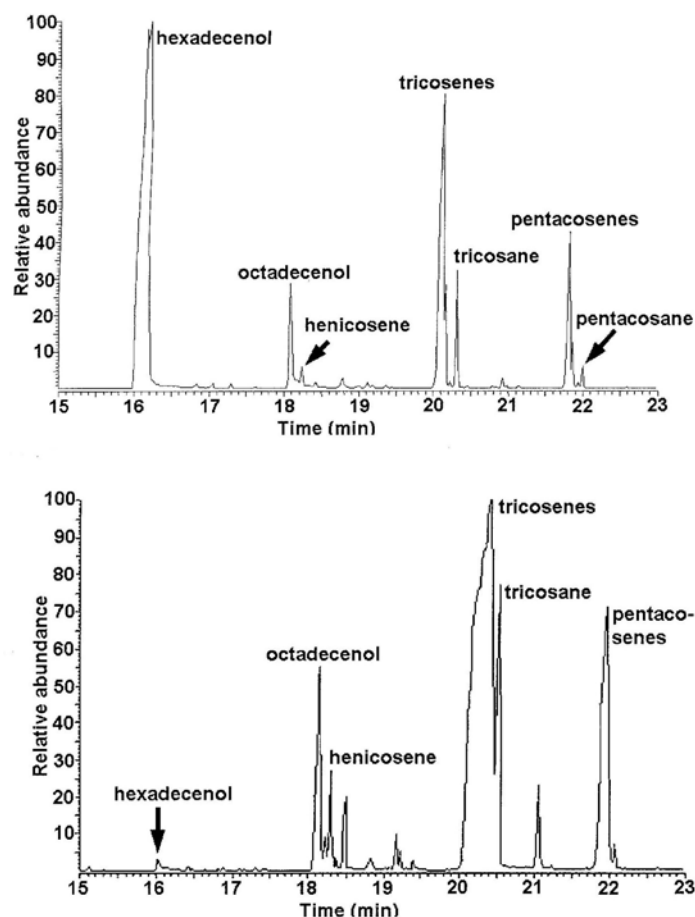


Figure 7. Chromatogrammes des sécrétions de deux spécimens de *Bombus ruderarius* (Müller).
D'après Terzo *et al.* (2005).

Les variabilités qualitatives et quantitatives des sécrétions déposées par les mâles sont toutes deux importantes dans la réussite de la rencontre avec une jeune femelle. La femelle choisit surtout son conjoint en fonction de ses phéromones de marquage (Bergman, 1997).

La taille du corps du mâle pourrait influencer la quantité de sécrétions déposées. L'âge est probablement aussi un facteur qui influence la variabilité (Ågren *et al.*, 1979).

1.5. Variabilité journalière

Bergman (1997) a étudié les variations diurnes qui apparaissent dans les sécrétions des glandes labiales céphaliques de *Bombus lapidarius* (L.). Les marques étudiées montrent une variabilité qualitative et quantitative. La mesure de la quantité des deux composés majeurs présents dans les glandes montre une variabilité journalière qui correspond au comportement prénuptial. Les mâles marquent surtout le matin, entre 9h et 12h, ce qui correspond à une diminution de l'abondance des sécrétions contenues dans les glandes. L'après-midi, le comportement de marquage n'est quasiment plus pratiqué par le mâle et la quantité de sécrétions contenue dans les glandes augmente à nouveau jusqu'au marquage suivant le lendemain matin.

1.6. Variabilité due à l'âge

Les changements avec l'âge de l'ultrastructure et du contenu des glandes labiales de plusieurs espèces de bourdons ont été étudiés par Ågren *et al.* (1979). Les espèces utilisées pour cette étude sont *Bombus lapidarius* (L.), *B. hypnorum* (L.), *Bombus hortorum* (L.) et *Bombus terrestris* (L.). L'étude de la morphologie a été réalisée par observations au microscope électronique à balayage et à transmission (tab. 2.). Au microscope électronique à balayage Ågren observe que l'apparence des acini qui constituent les glandes céphaliques labiales diverge d'une espèce à l'autre. Ils sont lisses chez *Bombus lapidarius*, alors que ceux de *Bombus terrestris* présentent une surface ridée. Le tableau 2. résume les différentes observations de Ågren au microscope électronique à transmission.

Tableau 2. Chronologie des modifications histologiques des glandes labiales céphaliques chez *Bombus lapidarius* et *Bombus hypnorum*

Age	Observations générales	Lumière des acini	Vésicules cellulaires claires	Taille des cellules	Noyau
5 jours avant émergence	glandes peu différenciées	vide	absentes	?	rond
1 jour avant émergence	cellules + denses, + différenciées, acini + lisses	vide	absentes	?	rond
1 jour ½	-	apparition d'un matériel dense aux électrons	peu nombreuses	20µm	rond
De 2 à 4 jours	réorganisation des organites cellulaires	large	abondantes	10-20µm	aplati
De 5 à 25 jours	-	large	abondantes	5-10µm	aplati et + dense
40 jours	dégénérescence	?	abondantes	5 à 10µm	pycnotique

La plupart des observations effectuées traitent de *Bombus lapidarius*.

Cinq jours avant l'émergence, les glandes sont peu différenciées et vides de toute sécrétion. Un jour avant l'émergence, les cellules apparaissent plus denses et plus différenciées, il n'y a pas de sécrétion dans la lumière. L'acinus entier semble légèrement moins ridé qu'auparavant.

A 1 jour ½, une quantité élevée de matériel dense aux électrons est trouvée dans les acini, les cellules mesurent 20µm de hauteur. Des vésicules claires apparaissent et résultent probablement des mécanismes de sécrétion.

Entre 2 et 4 jours, les acini commencent à se remplir. Les organites cellulaires se réorganisent et, à 4 jours, les cellules ne mesurent plus que 10µm de hauteur tandis que leur noyau s'aplatit.

Entre 5 et 25 jours, le remplissage des acini se poursuit, ce qui entraîne à nouveau une diminution de la hauteur des cellules. Leur noyau se densifie.

A 40 jours, les cellules montrent des signes de dégénérescence et le noyau se pycnose, les cellules mesurent 5 à 10µm de hauteur. Des sécrétions sont encore observables dans la lumière. Il faut toutefois remarquer qu'il y a peu de chances de rencontrer des bourdons aussi âgés dans des conditions naturelles.

Ågren remarque que durant les premiers jours qui suivent l'émergence, les mâles ne quittent pas le nid, ils sont incapables de voler et la production de phéromones n'est pas encore pleinement établie. Les mâles peuvent rester entre 2 et 7 jours dans la colonie, en fonction des conditions climatiques. Cette période leur permet probablement de se développer physiquement et sexuellement afin que la production phéromonale atteigne son maximum au moment où le mâle quitte le nid.

1.7. Objectifs

Ce travail cherche à répondre aux questions suivantes : y a-t-il une variabilité de la composition des sécrétions au cours du temps ? L'abondance relative des divers composés, majeurs, moyens et mineurs, évolue-t-elle avec l'âge des animaux ? Une des deux voies métaboliques (synthèse des acides gras et de la mévalogénine) se met-elle en place avant l'autre ?

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel biologique

Une colonie unique de *Bombus terrestris* (L.) est utilisée dans le cadre de cette étude. Elle est fournie par la société *Biobest* bvba, Westerlo, Belgique. Le choix de *B. terrestris* est motivé par la facilité d'élevage de l'espèce, sa disponibilité commerciale et la production d'un grand nombre de mâles.

2.1.1. Conditions d'élevage de la colonie

La colonie reçue est à un stade avancé : elle comporte une reine, une centaine d'ouvrières et de nombreux pains d'ouvrières mais pas encore de pains contenant des sexués.

Dès sa réception, le couvain et tous les individus sont transférés dans un nid artificiel en plexiglas muni d'un socle en bois de sapin non traité (19 x 19 x 37 cm) (fig. 8.).

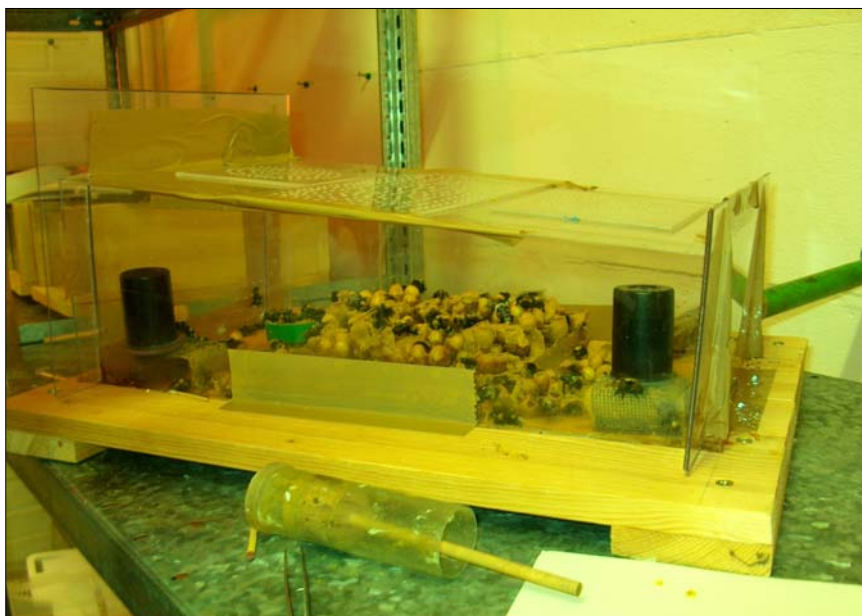


Figure 8. Colonie installée dans un nid de plexiglas.

La partie supérieure réserve des ouvertures par lesquelles l'introduction de pollen et de nectar est possible. La nourriture est distribuée *ad libitum* et remplacée tous les jours afin d'éviter le développement de parasites ou de moisissures.

Le nid est maintenu dans une pièce occultée équipée d'un système de chauffage et d'un humidificateur. La température est comprise entre 25°C et 32°C et l'humidité relative entre 25% et 55%. Ces valeurs résultent des mesures effectuées durant 62 jours. La température correspond aux paramètres climatiques optimaux en salle d'élevage déterminés par Djegham (1991) (29°C). Par contre, l'humidité relative est nettement plus basse que l'optimum indiqué par Djegham (1991) (80%).

2.1.2. Isolement des mâles

Tous les jours à heure fixe, les mâles nouvellement émergés sont retirés de la colonie, marqués par une étiquette numérotée collée sur le thorax et placés dans des petites cages de vol en bois de sapin non traité (13,5 x 12 x 8,5 cm). La partie supérieure est couverte d'un grillage à travers lequel les mâles peuvent lécher le nectar distribué *ad libitum* (fig. 9.). Ils sont conservés dans les mêmes conditions que la colonie pendant 3 jours afin de reproduire les conditions naturelles.



Figure 9. Cages des mâles.

Dans les conditions naturelles, les mâles de bourdons ne quittent pas la colonie avant 2-3 jours. Cette période est nécessaire à la sclérification de la cuticule et au durcissement des ailes (Ågren *et al.*, 1979).

Les mâles sont regroupés dans les petites cages en fonction de la programmation de leur date de sacrifice.

2.1.3. Détermination des classes d'âge

Une courbe de survie des mâles de *Bombus terrestris* (L.) est recalculée à partir de données de Regali (1996) (fig. 10.).

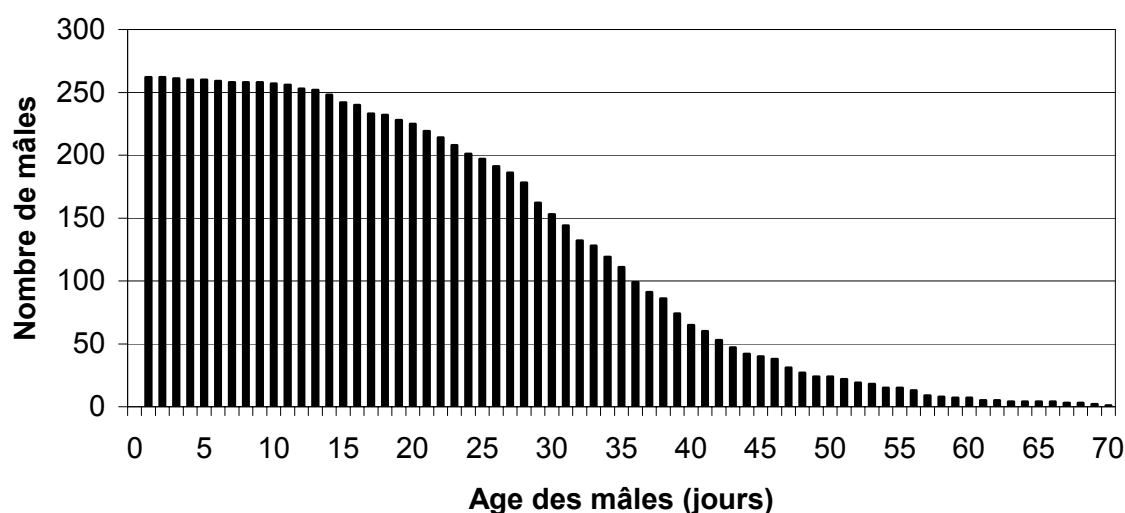


Figure 10. Courbe de survie des mâles de *B. terrestris*. Recalculée d'après les données de Regali (1996).

Cette courbe est une sigmoïde avec un point d'inflexion situé à environ 30 jours.

L'âge maximal auquel les bourdons sont sacrifiés est de 40 jours bien qu'à cet âge la mortalité soit élevée ($\pm 75\%$).

13 classes d'âge sont choisies pour l'analyse :

0,1,2,3,4,5,7,10,15,20,25,30 et 40 jours.

L'évolution des sécrétions durant les 5 premiers jours qui suivent l'émergence est particulièrement importante pour observer la mise en place des voies métaboliques et l'apparition des différents composés.

Ensuite, les âges de sacrifice sont espacés de 5 jours.

Après 25 jours, le taux de mortalité est tel que si le nombre de classes choisies est élevé, il faut une natalité énorme pour obtenir du matériel en suffisance. Le nombre de classes est donc limité à 2 pour l'étude d'un éventuel changement de composition des sécrétions à 30 et 40 jours.

2.1.4. Détermination de la date de sacrifice

Un tableau est rempli au fur et à mesure de l'émergence des mâles (tab. 3.). En procédant ainsi, toutes les classes sont peuplées de manière régulière.

Tous les mâles destinés à être sacrifiés à la même date sont réunis dans une cage commune.

Tableau 3. Tableau type de détermination de l'âge de sacrifice

Ordre d'émergence	Date émergence D	Age sacrifice (jours) A	Date sacrifice	Marquage
1	D ₁	0	D ₁ + A ₁	
2	D ₂	1	D ₂ + A ₂	
3	D ₃	2	D ₃ + A ₃	
4	D ₄	3	D ₄ + A ₄	
5	D ₅	4	D ₅ + A ₅	
6	D ₆	5	D ₆ + A ₆	
7	D ₇	7	D ₇ + A ₇	
8	D ₈	10	D ₈ + A ₈	
9	D ₉	15	D ₉ + A ₉	
10	D ₁₀	20	D ₁₀ + A ₁₀	
11	D ₁₁	25	D ₁₁ + A ₁₁	
12	D ₁₂	30	D ₁₂ + A ₁₂	
13	D ₁₃	40	D ₁₃ + A ₁₃	
14	D ₁₄	0	D ₁₄ + A ₁₄	
15	D ₁₅	1	D ₁₅ + A ₁₅	
...				
n	D _n	A _n	D _n + A _n	

2.1.5. Condition d'élevage des mâles

Après 3 jours passés en salle d'élevage, les mâles sont placés dans une autre pièce, éclairée par 3 tubes fluorescents et 3 lampes halogènes reliées à un programmeur pour une durée d'éclairement de 12h (de 8h à 20h). La luminosité mesurée est de 9000 Lux. L'éclairage de cette deuxième pièce a pour but de conserver les mâles dans des conditions les plus proches possibles des conditions naturelles. Un chauffage d'appoint permet de conserver une température minimale de 20°C. Il est relié à un programmeur et fonctionne de 13h à 15h. La température de la pièce, pendant 66 jours, est maintenue entre 19°C et 27°C. D'après Djegham (1991), la température optimale d'une salle d'expérimentation est de 20°C.

2.1.6. Sacrifice des mâles

A la date prévue, les mâles sont placés individuellement dans des petites boîtes et sacrifiés par congélation à -30°C .

2.2. Dissection des glandes céphaliques labiales

2.2.1. Technique de dissection

A l'aide d'un scalpel, on pratique une incision verticale, du haut vers le bas, le long des yeux afin d'enlever ceux-ci. Les glandes labiales céphaliques se trouvent juste derrière les yeux et leur volume important les rend facilement identifiables. Elles sont prélevées avec une pince fine et placées dans un flacon avec $200\mu\text{l}$ d'hexane (Terzo *et al.*, 2005) (fig. 11.).

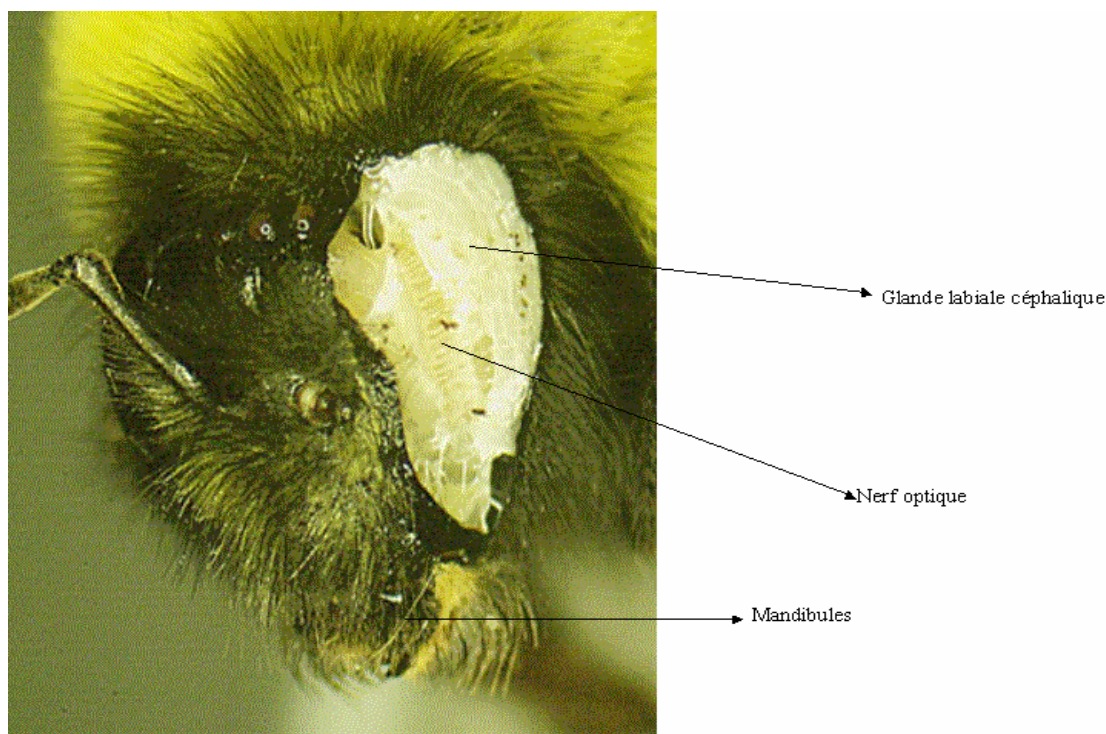


Figure 11. Dissection des glandes labiales céphaliques. L'œil gauche a été enlevé laissant voir les glandes labiales céphaliques.

2.2.2. Conservation des glandes

Les flacons qui contiennent l'hexane et les glandes, sont conservés 24h à température ambiante. Cela permet aux différents composés qui constituent les sécrétions de diffuser dans l'hexane. Après un jour, les glandes sont placées à -30°C jusqu'au moment de l'analyse (Terzo *et al.*, 2005). Cette congélation évite la dénaturation des composés de la solution.

2.3. Analyse chimique

2.3.1. Technique du GC-MS

L'analyse de la composition des sécrétions est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) de marque Finnigan GCQ. Le spectromètre de masse utilisé est de type « ion trap ».

La colonne capillaire du GC est une colonne apolaire DB-5ms (phase stationnaire constituée de 5%-phenyl-methylpolysiloxane), longue de 30m avec un diamètre intérieur de 0,25mm et une épaisseur de film de 0,25µm.

La température de l'injecteur est de 220°C. Initialement, la colonne se trouve à une température de 70°C, cette température est maintenue durant les 2 minutes qui suivent l'injection. La température finale de 320°C est atteinte à raison d'une augmentation de 10°C/min puis maintenue à 320°C pendant 3 minutes. Le gaz propulseur utilisé est l'hélium. Sa vitesse d'injection est maintenue constante à 50cm/sec.

Les spectres de masse sont obtenus en mode impact d'électrons « full scan (30-600) » (Terzo *et al.*, 2005).

Un injecteur automatique est utilisé. Il est programmé pour effectuer les étapes suivantes :

- 5 rinçages de 5µl avec de l'hexane avant l'injection
- 5 rinçages dans la solution à analyser
- injection dans le GC-MS de 1µl de la solution à analyser
- 5 rinçages de 5µl avec de l'hexane

De cette manière la vitesse d'introduction de la solution dans le GC est constante. Cela évite les biais liés à une injection manuelle et les décalages temporels observables alors sur les chromatogrammes (fig. 12.).



Figure 12. GC-MS utilisé pour les analyses.

2.3.2. Tirage aléatoire

Sur les 234 solutions obtenues après dissection, seules 130 (10 par classe) sont analysées par GC-MS. Ces 130 solutions sont tirées au sort à l'aide d'une table de nombres générés aléatoirement par le logiciel R (R Development Core Team, 2004). Le tirage aléatoire permet de limiter les biais induits par le protocole analytique.

2.4. Analyse statistique

2.4.1. Constitution de la matrice

Le logiciel Xcalibur calcule l'intégrale de la surface des pics. Cette dernière est déterminée par différents paramètres choisis: largeur minimale du pic, hauteur minimale du pic... Ces paramètres restent identiques pour traiter tous les chromatogrammes (fig. 13.).

Pour chaque individu il est possible d'extraire un tableau qui contient le temps de rétention (RT), l'aire (AA) et le pourcentage que représente l'aire de chaque pic par rapport à la surface totale des pics du chromatogramme. Ces informations sont utilisées pour constituer la matrice de données.

La première étape consiste à éliminer les pics dont l'aire est inférieure à 0,05% de la surface totale du chromatogramme. Leur détection est en effet trop dépendante du bruit de fond.

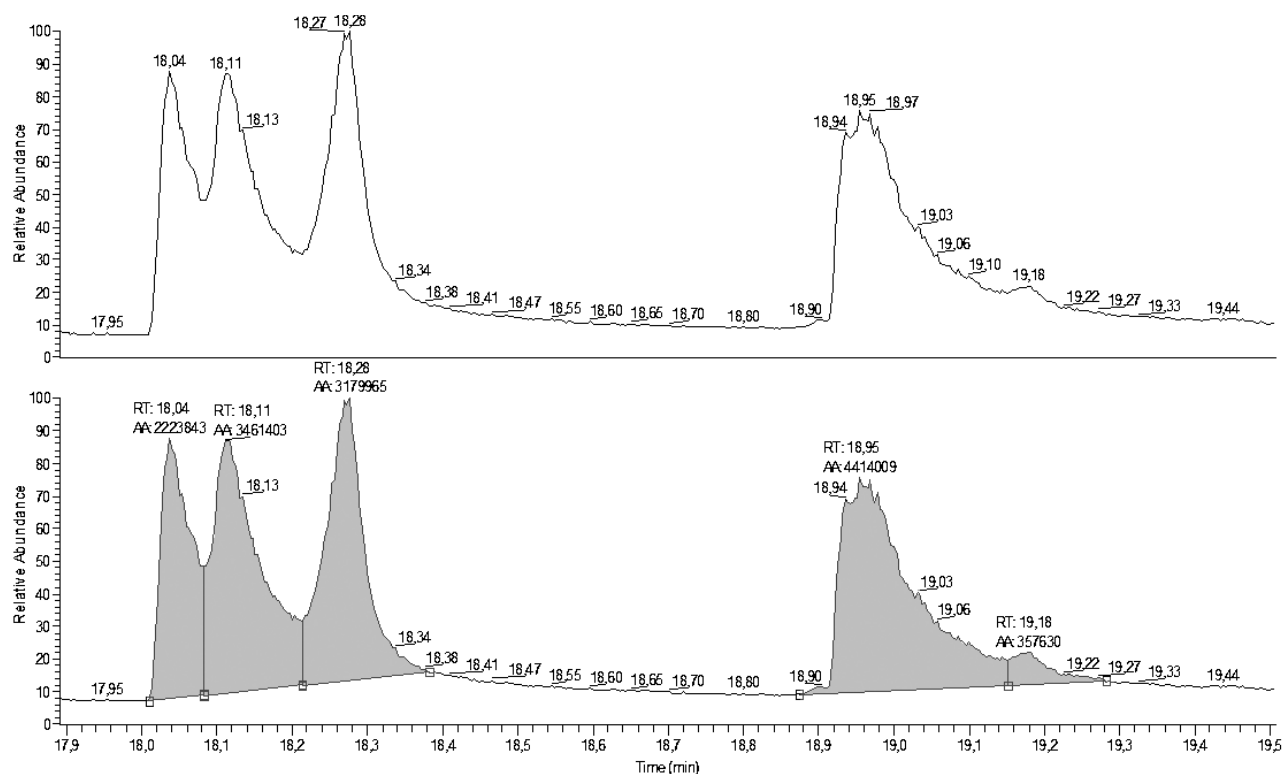


Figure 13. Chromatogramme d'un *B. terrestris* de 15 jours avant le calcul de l'intégrale (haut), le même chromatogramme après le calcul de l'intégrale (bas).

Chaque pic est ensuite comparé au chromatogramme d'un individu de référence. Il est possible de déterminer si deux pics que l'on compare sont constitués du même composé ou non sur base du temps de rétention et du spectre de masse.

18 spécimens sont éliminés de l'étude, car l'analyse de leurs sécrétions à échoué. Finalement la matrice obtenue est constituée de 112 lignes (individus) et de 49 colonnes (composés), les valeurs qu'elle contient sont les aires de chaque pic.

2.4.2. Analyse par classe d'âge

2.4.2.1. Analyse discriminante linéaire de 13 classes d'âge

L'analyse discriminante linéaire (ADL) permet de comparer des populations connues sur base de p variables. Après le calcul d'une combinaison linéaire des variables, cette analyse recherche la meilleure discrimination possible des groupes (Tomassone, 1988). La position des axes dans l'espace est définie par les coefficients de discrimination linéaire des variables. La combinaison de ces coefficients est déterminée de telle manière qu'on observe la plus grande variance possible entre les groupes.

En fin d'analyse, on effectue une matrice de confusion. Cette opération permet de calculer le taux d'individus reclassés dans le bon groupe par rapport à l'effectif théorique.

La matrice utilisée pour cette analyse est de rang 112 individus x 49 composés et exprime la surface des pics.

L'ADL est effectuée, dans le cadre de ce travail à l'aide du logiciel R.

Le script qui permet d'effectuer l'ADL dans R est joint en annexe (Annexe 1.).

2.4.2.2. Analyse discriminante linéaire de 4 classes d'âge

Le même principe qu'au point précédent est utilisé mais, au lieu de 13 classes d'âge, seulement 4 classes sont définies. Ces 4 classes sont délimitées en s'inspirant de ce qu'on sait sur les phases de vie des mâles (Ågren *et al.* 1979; Svensson 1980). La classe des individus âgés de 0 jours est conservée. A cet âge les mâles ne possèdent pas encore de coloration et d'après Ågren *et al.* (1979) la sécrétion n'a pas encore débuté. Les individus âgés de 1 à 4 jours sont regroupés pour former la deuxième classe d'âge, cela correspond à la période de vie intranidale, période durant laquelle la cuticule se sclérifie et les ailes durcissent (Ågren *et al.*, 1979). La troisième classe d'âge contient les mâles âgés de 5 à 25 jours. D'après Svensson (1980), la durée de vie des mâles de bourdon est limitée à 3 à 4 semaines, durant cette période de leur vie, les mâles marquent activement et sont aptes à se reproduire. Enfin, les mâles âgés de 30 et 40 jours sont groupés dans la quatrième classe d'âge. Il est à noter que dans la nature, il est fort peu probable de capturer des mâles aussi âgés.

La matrice utilisée pour effectuer cette ADL est de rang 112 individus x 49 composés et exprime la surface des pics. Une matrice de confusion est aussi appliquée aux résultats de cette analyse.

2.4.2.3. Méthode de classification hiérarchique

Au départ de la matrice de données brutes de rang 112 individus x 49 composés qui exprime la surface des pics, on construit une matrice des surfaces moyennes des composés par classe d'âge (13 classes x 49 composés). De cette matrice, on tire une matrice de rang croissant des surfaces dans le vecteur de la classe.

On calcule la distance euclidienne de cette matrice de rang. Le choix de la distance euclidienne se justifie par le fait que cette méthode conserve la proportionnalité des distances entre les objets. La matrice de distance euclidienne (rang 13 x 13) est utilisée afin de construire un dendrogramme par lien UPGMA.

Le calcul de la distance euclidienne et la réalisation du dendrogramme sont effectuées grâce au logiciel NTSYS (Rholff, 1993).

La méthode IndVal (Dufrêne & Legendre, 1997) est utilisée afin d'identifier les variables qui permettent la division aux différents niveaux du dendrogramme.

2.4.3. Analyse par individu

L'analyse en composantes principales (ACP) permet de déterminer quelle est la plus grande variance que l'on peut trouver dans un groupe composé de n objets, ainsi que les variables qui sont responsables de cette variance.

La matrice utilisée pour effectuer cette analyse est tirée de la matrice de données brutes (112 individus x 49 composés, exprimant la surface des pics), mais ne contient que les individus âgés de 7 à 25 jours, tels qu'on pourrait les capturer dans la nature. Le rang de cette matrice est donc 44 individus x 48 composés (un des composés est absent chez les 44 individus, il s'agit de l'icosane).

L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel R. Le script qui permet d'effectuer l'ACP dans R est joint en annexe (Annexe 2).

Avant l'ACP, une analyse d'Escoufier (Escoufier, 1970) est appliquée aux variables. Cette méthode permet de réduire le nombre de variables à un nombre inférieur au nombre d'individus. Escoufier permet d'identifier les variables qui expriment un maximum de variabilité et d'éliminer les variables qui leur sont fortement corrélées et qui peuvent être ainsi ôtées de l'analyse.

3. Résultats

3.1. Elevage

La colonie a produit 288 mâles. 54 d'entre eux sont morts avant la date de sacrifice prévue. Seuls 234 mâles ont été disséqués.

Tableau 4. Nombre de mâles disséqués par classe d'âge

Classes d'âge	0	1	2	3	4	5	7
	20	20	20	20	20	20	19
Classes d'âge	10	15	20	25	30	40	Total
	20	20	18	15	11	11	234

3.2 Injection au GC-MS

Après tirage au sort, 10 solutions pour chacune des 13 classes sont analysées par GC-MS.

3.2.1. Chromatogrammes

Les chromatogrammes obtenus par injection des solutions montrent dès les premières observations qu'il y a une variation de la composition des sécrétions dans les différentes classes d'âge (fig. 14.). La molécule qui présente la plus haute concentration relative diffère dans les 3 chromatogrammes présentés.

Il s'agit de l'henicosane (TR= 18,41) chez les individus âgés d'1 jour, du terrestrol (TR= 14,49) chez les individus âgés de 15 jours et du tricosane (TR= 20,14) chez les individus âgés de 40 jours (fig.14.).

Abondance relative

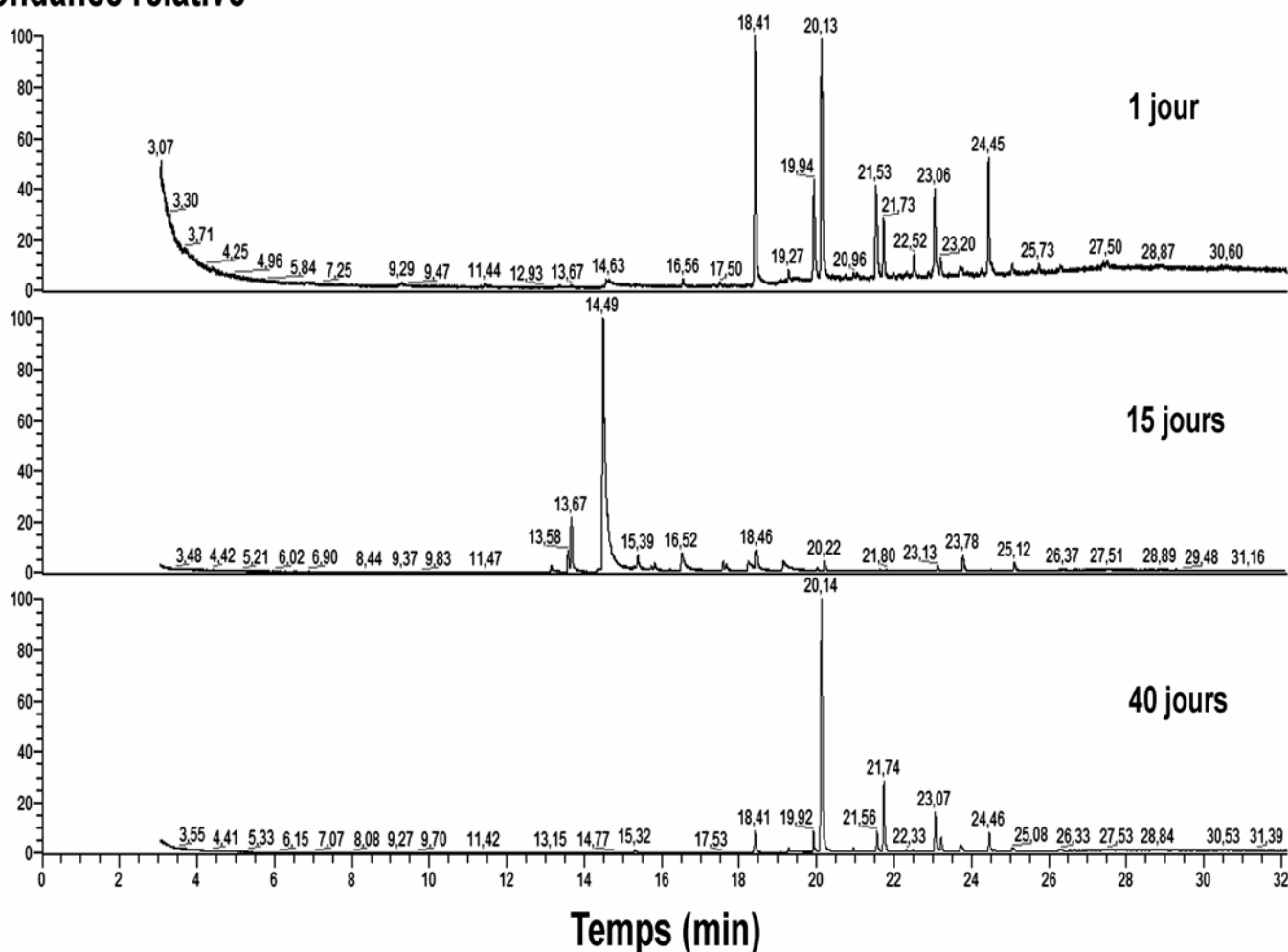


Figure 14. Chromatogrammes représentatifs de 3 classes d'âge, respectivement 1, 15 et 40 jours.
Temps= temps de rétention (TR)

3.2.2. Identification des composés

L'identification des composés est confiée au Prof. Irena Valterova, à Prague. Elle est effectuée sur un individu standard, capturé dans la nature. Dans le cadre de cette étude, un plus grand nombre de composés a pu être isolé mais ils n'ont pas tous pu être identifiés.

La moyenne de l'aire des composés est calculée au sein de chaque classe d'âge. Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5. Molécules identifiées dans les sécrétions des glandes labiales céphaliques de *Bombus terrestris* et leur temps de rétention

	Molécules identifiées	Temps de rétention (min)	Spécimen de référence (âge)
X1	non identifiée	13,06	/
X2	alcene	13,10	224 (0 jours)
X3	ethyl dodecanoate	13,13	70 (10 jours)
X4	tetradecanal	13,21	70 (10 jours)
X5	non identifiée (terpène)	13,40	70 (10 jours)
X6	dihydrofarnesal	13,46	70 (10 jours)
X7	non identifiée	14,47	/
X8	dihydrofarnesol (terrestrol)	14,57	70 (10 jours)
X9	ethyl tetradec-9-enoate	15,15	70 (10 jours)
X10	ethyl tetradecanoate	15,25	70 (10 jours)
X11	hexadec-7-enal	15,54	70 (10 jours)
X12	hexadecanal	15,65	70 (10 jours)
X13	hexadec-9-en-1-ol	16,11	70 (10 jours)
X14	non identifiée (terpène)	16,24	70 (10 jours)
X15	hexadecan-1-ol	16,34	70 (10 jours)
X16	ethyl hexadec-9-enoate	17,08	70 (10 jours)
X17	hexadec-9-enyl acetate 1	17,16	70 (10 jours)
X18	non identifiée	17,28	/
X19	alcane	17,37	70 (10 jours)
X20	icosane	17,40	224 (0 jours)
X21	hexadec-9-enyl acetate 2	17,43	70 (10 jours)
X22	octadec-9-enal	17,50	70 (10 jours)
X23	octadeca-9,12-dien-1-ol	18,04	70 (10 jours)
X24	octadeca-9,12,15-trien-1-ol	18,11	70 (10 jours)
X25	hénicosane	18,28	70 (10 jours)
X26	geranylcitronellol	18,95	70 (10 jours)
X27	docosane	19,18	70 (10 jours)
X28	dihydrofarnesyl acetate	19,51	70 (10 jours)
X29	tricos-9-ene	19,84	70 (10 jours)
X30	tricosane	20,04	70 (10 jours)
X31	non identifiée	20,10	/
X32	tetracosane	20,63	32 (7 jours)
X33	tetracosane+ icos-15-enyl acetate	20,95	257 (10 jours)
X34	pentacos-9-ene	21,47	70 (10 jours)
X35	pentacosane	21,65	70 (10 jours)
X36	non identifiée (terpène)	21,87	70 (10 jours)
X37	hexacos-9-ene	22,23	70 (10 jours)
X38	hexacosane	22,48	219 (25 jours)
X39	heptacos-9-ene	23,03	70 (10 jours)
X40	heptacosane	23,17	70 (10 jours)
X41	octacosene	23,38	117 (25 jours)
X42	octacosane	23,51	117 (25 jours)
X43	dihydrofarnesyl dodecanoate	23,63	70 (10 jours)
X44	nonacos-9-ene	24,35	70 (10 jours)
X45	dihydrofarnesyl tetradecanoate	24,96	70 (10 jours)
X46	cire 1	26,21	70 (10 jours)
X47	cire 2	26,53	70 (10 jours)
X48	cire 3	27,40	70 (10 jours)
X49	cire 4	27,63	70 (10 jours)

Tableau 6. Aire moyenne des composés par classe d'âge (%)

TR	Composés	J00	J01	J02	J03	J04	J05	J07	J10	J15	J20	J25	J30	J40
13,06	X1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,28	-	-	-
13,10	alcène	0,26	0,06	-	+	-	-	-	-	+	0,01	-	0,04	0,20
13,13	ethyl dodecanoate	-	0,03	-	0,01	+	0,01	-	+	+	1,41	0,38	0,98	1,55
13,21	tetradecanal	-	0,13	0,10	0,11	2,80	1,46	0,76	0,44	1,14	2,58	3,50	0,02	0,16
13,40	terpène	+	0,21	0,51	0,60	0,95	1,02	1,08	1,41	1,06	0,81	0,44	0,13	0,18
13,46	dihydrofarnesal	0,27	2,54	2,28	1,99	1,83	1,88	1,70	1,53	1,76	2,61	0,62	0,37	0,17
14,16	X7	0,04	0,07	0,07	0,11	0,09	0,10	0,12	0,14	0,11	0,16	0,08	-	0,03
14,57	dihydrofarnesol	3,72	46,29	44,68	41,79	42,10	49,93	47,28	46,61	46,05	27,98	27,22	1,87	1,11
15,15	ethyl tetradec-9-enoate	-	0,05	0,03	0,08	0,35	0,09	0,06	0,09	0,13	0,17	0,10	0,28	0,39
15,25	ethyl tetradecanoate	0,20	0,22	0,08	0,20	0,42	0,23	0,28	0,23	0,27	0,81	0,84	2,23	3,21
15,54	hexadec-7-enal	+	0,51	0,47	0,29	0,52	0,30	0,19	0,22	0,30	0,48	0,05	0,14	0,26
15,65	hexadecanal	-	0,23	0,29	0,23	0,17	0,16	0,12	0,17	0,16	0,46	0,03	0,18	0,27
16,11	hexadec-9-en-1-ol	-	-	-	-	-	-	+	0,01	+	-	0,01	-	-
16,24	terpène?	-	-	-	0,02	0,07	0,06	0,14	0,21	0,11	-	-	-	-
16,34	hexadecan-1-ol	0,89	1,87	2,73	3,07	2,94	2,94	3,24	3,87	3,22	1,55	0,70	0,09	0,09
17,08	ethyl hexadec-9-enoate	0,02	0,01	-	0,02	0,10	0,06	0,06	0,04	0,06	0,03	+	0,45	0,58
17,16	hexadec-9-enyl acetate 1	0,06	0,04	-	0,08	0,17	0,08	0,11	0,18	0,13	0,04	0,05	-	0,04
17,28	X18	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
17,37	alcane	+	0,04	-	-	+	0,04	0,07	+	0,03	-	0,02	-	+
17,40	eicosane	0,18	0,03	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17,43	hexadec-9-enyl acetate 2	0,19	0,31	0,27	0,24	0,13	0,04	0,09	0,10	0,11	0,33	0,03	0,21	0,16
17,50	octadec-9-enal	0,09	0,45	0,62	0,63	0,48	0,25	0,19	0,19	0,30	0,72	0,03	0,16	0,25
18,04	octadeca-9,12-dien-1-ol	-	0,78	2,58	4,80	2,58	2,39	4,07	2,67	3,02	0,28	0,11	-	-
18,11	octadeca-9,12,15-trien-1-ol	-	0,14	1,99	1,88	2,36	2,67	3,37	2,61	2,64	0,40	0,18	-	-
18,28	hénicosane	25,20	11,71	5,23	3,63	2,66	2,12	2,10	2,57	2,74	5,83	1,23	5,46	5,54
18,95	geranylcitronellol	-	2,47	6,70	7,47	9,00	8,74	9,20	10,14	8,99	1,34	0,19	0,33	0,04
19,18	docosane	2,77	0,36	0,01	0,05	1,12	0,96	0,85	0,24	0,70	0,74	0,10	1,42	1,52
19,51	dihydrofarnesyl acetate	0,05	0,02	0,11	0,01	0,08	0,09	-	0,09	0,06	0,05	0,02	0,22	0,05
19,84	tricos-9-ene	7,84	4,14	2,23	1,82	1,58	1,20	1,30	1,35	1,47	2,64	0,73	2,82	3,67
20,04	tricosane	21,48	10,03	9,97	11,78	10,96	11,11	9,70	11,63	10,96	14,26	4,27	40,17	42,07
20,10	X31	0,45	0,06	0,01	-	-	-	0,04	+	0,01	0,09	0,04	-	-
20,63	tetracosane	-	-	-	-	-	-	0,25	-	0,05	-	0,02	-	-
20,95	tetracosane+ icos-15-enyl acetate	1,05	0,38	1,13	0,64	1,30	0,69	0,13	0,32	0,59	0,47	0,15	0,38	0,42
21,47	pentacos-9-ene	7,56	3,45	1,91	1,31	1,16	0,90	1,07	1,04	1,14	2,25	0,61	2,86	3,51
21,65	pentacosane	4,03	1,60	2,00	2,90	2,68	2,45	2,34	2,54	2,51	3,31	0,82	12,48	9,43
21,87	terpène?	0,55	0,20	0,04	0,01	0,12	0,02	0,04	0,08	0,06	-	0,01	0,01	0,01
22,23	hexacos-9-ene	0,27	0,47	0,28	0,33	0,27	0,19	0,25	0,35	0,28	0,33	0,10	0,48	0,40
22,48	hexacosane	2,29	0,47	0,77	0,35	0,49	0,23	0,13	0,02	0,24	0,24	0,04	0,30	0,19
23,03	heptacos-9-ene	6,16	4,42	3,54	3,19	2,59	1,95	2,48	2,36	2,47	5,73	0,18	9,63	8,59
23,17	heptacosane	1,18	0,45	0,35	0,29	0,19	0,14	0,22	0,09	0,18	0,85	0,03	2,80	2,35
23,38	octacos-9-ene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,24	-	-
23,51	octacosane	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34	-	-
23,63	dihydrofarnesyl dodecanoate	1,11	0,63	4,50	5,93	4,85	3,94	5,11	4,84	4,71	11,95	53,03	5,35	6,09
24,35	nonacos-9-ene	8,51	3,36	1,28	0,64	0,42	0,25	0,33	0,30	0,44	2,23	0,49	3,03	1,74
24,96	dihydrofarnesyl tetradecanoate	0,71	0,47	1,97	2,54	1,76	0,97	1,12	1,09	1,31	4,12	0,37	2,96	3,06
26,21	cire 1	0,17	0,06	0,14	0,08	0,10	0,04	0,06	0,03	0,06	0,49	0,08	0,49	0,40
26,53	cire 2	0,01	0,39	0,46	0,24	0,23	0,11	0,12	0,11	0,16	0,97	0,19	0,55	1,07
27,40	cire 3	0,03	0,03	0,07	0,31	0,07	0,02	0,06	0,05	0,07	0,21	0,05	0,22	0,79
27,63	cire 4	1,87	0,82	0,63	0,31	0,30	0,18	0,15	0,03	0,20	0,76	0,31	0,87	0,42

- : composé absent; + : aire < 0,005%; TR = temps de rétention; J00, J01, J02, J03, J04, J05, J07, J10, J15, J20, J25? J30 et J40= classes d'âge.

3.2.3. Analyses statistiques

3.2.3.1. Analyse discriminante linéaire

Une première analyse discriminante linéaire est effectuée sur base d'une matrice de 112 individus regroupés en 13 classes d'âge et des 49 composés identifiés (fig. 15.).

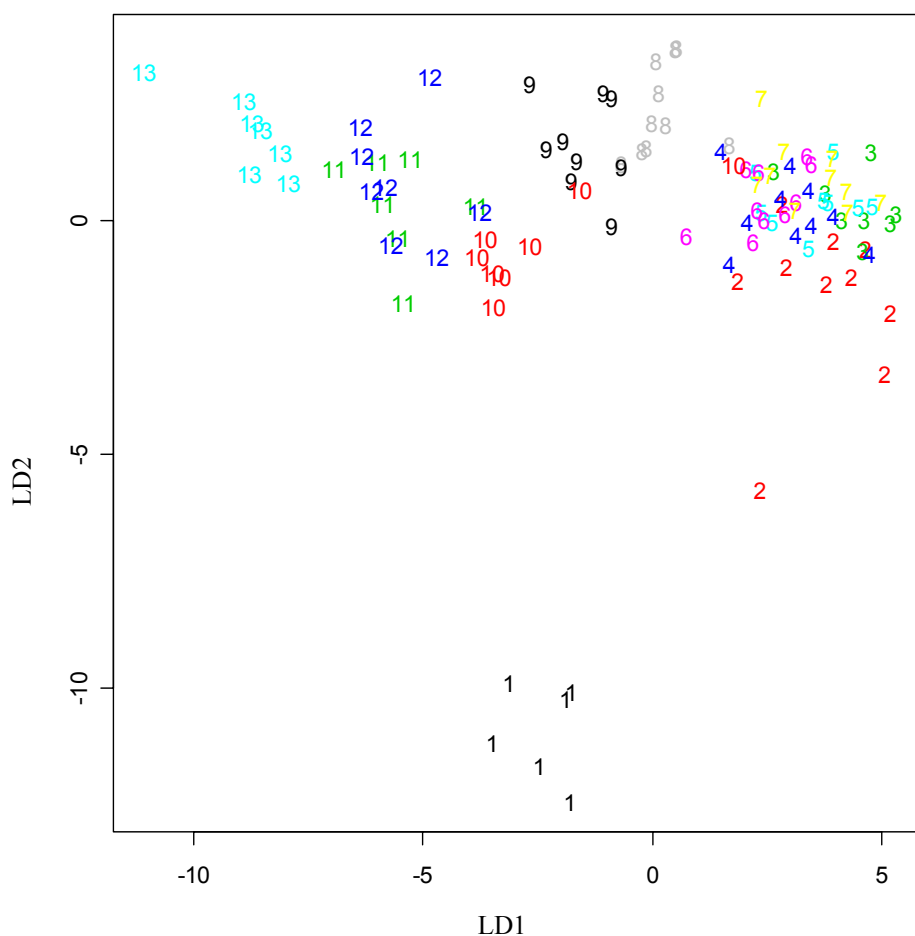


Figure 15. Représentation de la position des 112 individus sur les deux premiers axes de l'ADL .
 Les individus du groupe 1 = 0 jour, 2= 1 jour ; 3= 2 jours, 4= 3 jours, 5= 4 jours, 6= 5 jours, 7= 7 jours, 8= 10 jours, 9= 15 jours, 10= 20 jours, 11= 25 jours, 12= 30 jours et 13= 40 jours.

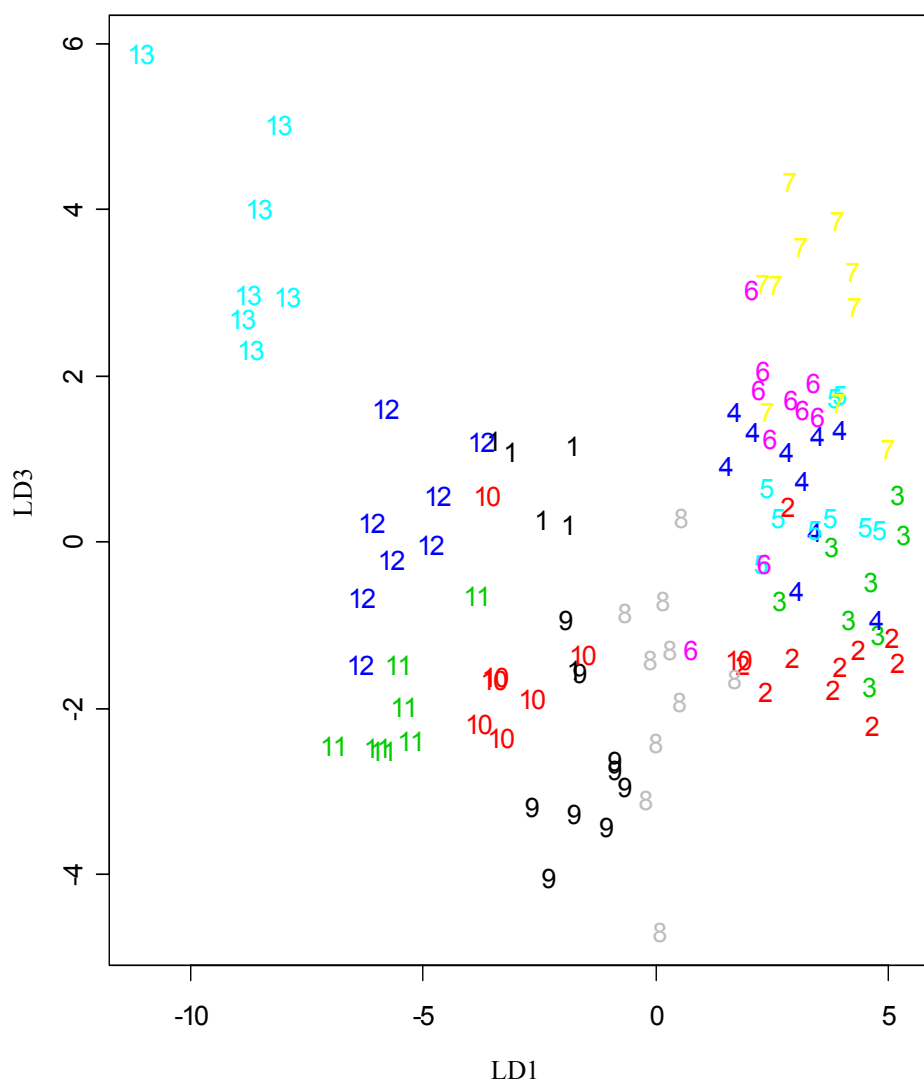


Figure 16. Représentation de la position des 112 individus sur les axes 1 et 3 de l'ADL. Les individus du groupe 1 = 0 jour, 2= 1 jour ; 3= 2 jours, 4= 3 jours, 5= 4 jours, 6= 5 jours, 7= 7 jours, 8= 10 jours, 9= 15 jours, 10= 20 jours, 11= 25 jours, 12= 30 jours et 13= 40 jours.

L'ADL sépare sur l'axe 1 les individus âgés de 1 à 10 jours des autres. L'axe 2 sépare principalement les individus âgés de 0 et 1 jours des autres. Le groupe d'individus âgés de 0 jours y est fortement isolé du reste. L'axe 3 (fig. 16.) permet de distinguer les individus jeunes des individus vieux dans les deux groupes séparés par l'axe 1 (moins de 10 jours ou plus de 10 jours). Il n'est pas possible de distinguer les 13 classes d'âge sans confusion en effet, on observe un continuum lié à l'âge entre les différents groupes. La matrice de confusion appliquée à cette analyse permet d'obtenir un taux global de séparation des groupes de 81%.

Les composés dont les coefficients de discrimination linéaire sont les plus élevés sur les 3 premiers axes sont : le dihydrofarnesol, l'henicosane, le geranylcitronellol et le tricosane. L'axe LD3 est influencé positivement par la présence du dihydrofarnesol et du tricosane et négativement par l'henicosane. L'axe 1 est influencé positivement par l'henicosane et le geranylcitronellol et négativement par le tricosane. L'axe 2 est influencé positivement par le geranylcitronellol et le tricosane et négativement par l'henicosane. A part l'isolement de la classe de 0 jour et le caractère progressif de la variation globale (forme en arc de cercle, fig. 15.), cette analyse n'apporte pas énormément d'informations.

Discrimination de classes d'âge naturelles

Une ADL est réalisée ici sur base des 49 composés afin de discriminer 4 classes d'âges naturelles établies sur base de la connaissance actuelle du mode de vie des mâles de bourdons (Ågren *et al.* 1979; Svensson, 1980).

La première classe d'âge concerne uniquement les individus âgés de 0 jours. Elle représente les mâles fraîchement émergés. La deuxième classe d'âge concerne les mâles âgés de 1 à 4 jours. Cela correspond à la période de vie intranidale des mâles. Pendant ce temps, les mâles restent dans le nid. Cette période est nécessaire à la sclérification de la cuticule et au durcissement des ailes. La troisième classe d'âge correspond aux mâles âgés de 5 à 15 jours. Cela correspond à la période de vie extranidale. Durant cette période les mâles vivent hors du nid, sans plus jamais y retourner jusqu'à leur mort. Durant la vie extranidale, les mâles marquent activement et sont aptes à se reproduire. La quatrième classe d'âge concerne les mâles âgés de 20 à 40 jours, elle correspond à la fin de vie.

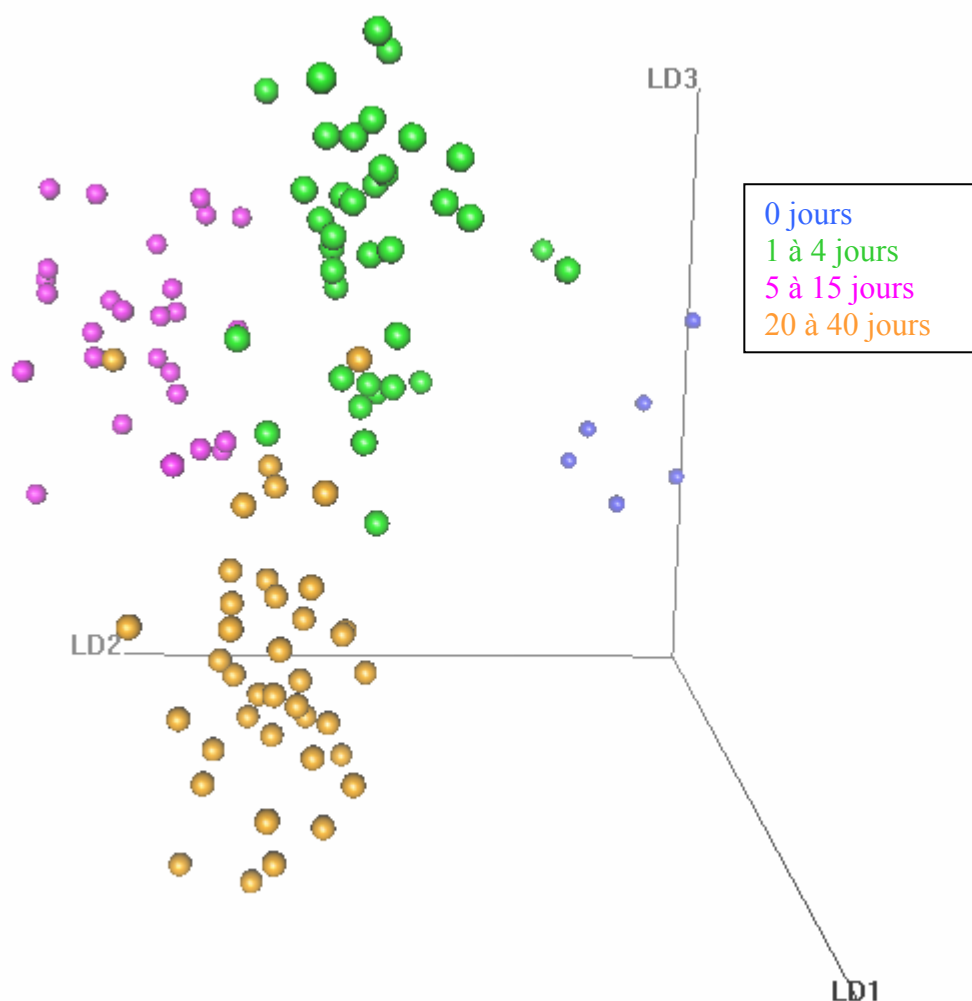


Figure 17. Représentation en trois dimensions de la position des individus sur les trois premiers axes de l'ADL. En bleu les mâles de 0 jour ; en vert les mâles de 1 à 4 jours ; en orange, les mâles de 5 à 15 jours et en rose, les mâles de 20 à 40 jours

Dans cette analyse, les 4 classes sont plus ou moins bien isolées les unes des autres. La classe des 0 jours est totalement séparée des 3 autres classes, sans aucun recouvrement. Les autres classes forment des nuages de points bien individualisés avec un léger recouvrement. Ce dernier est sans doute dû au continuum d'âge entre les diverses classes. La matrice de confusion permet de reclasser correctement 96% des individus. L'axe LD1 discrimine positivement les individus âgés de 1 à 15 jours, le composé qui a le plus de poids dans ce sens est le geranylcytronellol. Négativement sur cet axe, on trouve les individus de la classe 0 et ceux âgés de 20 à 40 jours, influencés par la présence de tricosane. LD2 sépare positivement les individus âgés de 0 jour, selon la présence de l'henicosane des individus dont l'âge est compris entre 2 à et 40 jours, leur position est déterminée par la présence de tricosane.

Enfin, LD3 discrimine principalement les individus âgés de 1 à 4 jours, influencés par la présence d'hexacosane, des individus âgés de 5 à 15 jours, influencés par la présence de pentacosane.

3.2.3.2. Classification hiérarchisée

Une matrice de rang basée sur la moyenne des surfaces par classe d'âge et les 49 composés est utilisée pour effectuer une classification hiérarchique. A partir de la matrice de rang on calcule une matrice de distance euclidienne. On représente ensuite un dendrogramme UPGMA (fig. 18.).

Les groupes qui résultent de cette méthode se rapprochent de ceux choisis pour effectuer l'ADL de 4 classes. Le groupe le plus distant et le mieux individualisé est le groupe des 30-40 jours, ce qui correspond à des mâles dont l'âge est largement supérieur à l'âge naturel de la mortalité (plus ou moins 20 jours). Le reste des bourdons se répartit dans deux grandes catégories : les 0-5 jours et les 7-25 jours, ce qui correspond aux périodes de vie intra- et extranidale du mâle de bourdon. Parmi le groupe des 0-5 jours, la classe de 0 jour s'individualise fort bien, ce qui indique qu'à la naissance, les sécrétions des glandes labiales céphaliques sont fort différentes de celles qui se mettent en place dès le premier jour qui suit l'émergence. Autrement dit, les sécrétions spécifiques de la glande labiale céphalique ne sont pas synthétisées avant l'émergence du bourdon, mais un jour après celle-ci.

Parmi le groupe des 7-25 jours, les mâles de 7 à 15 jours se distinguent des mâles plus âgés. Cela correspond à l'âge sexuellement actif des mâles. On considère en effet qu'après 20 jours les mâles sont très âgés.

Les composés qui permettent de séparer les groupes aux différents niveaux du dendrogramme sont identifiés à l'aide de la méthode IndVal (fig. 18.). Ils sont suivis d'un (+) s'ils sont plus abondants dans le groupe concerné que dans les autres et d'un (-) s'ils sont moins abondants dans le groupe concerné que dans les autres. L'abondance est déterminée par le rang de la molécule dans les différentes classes d'âge.

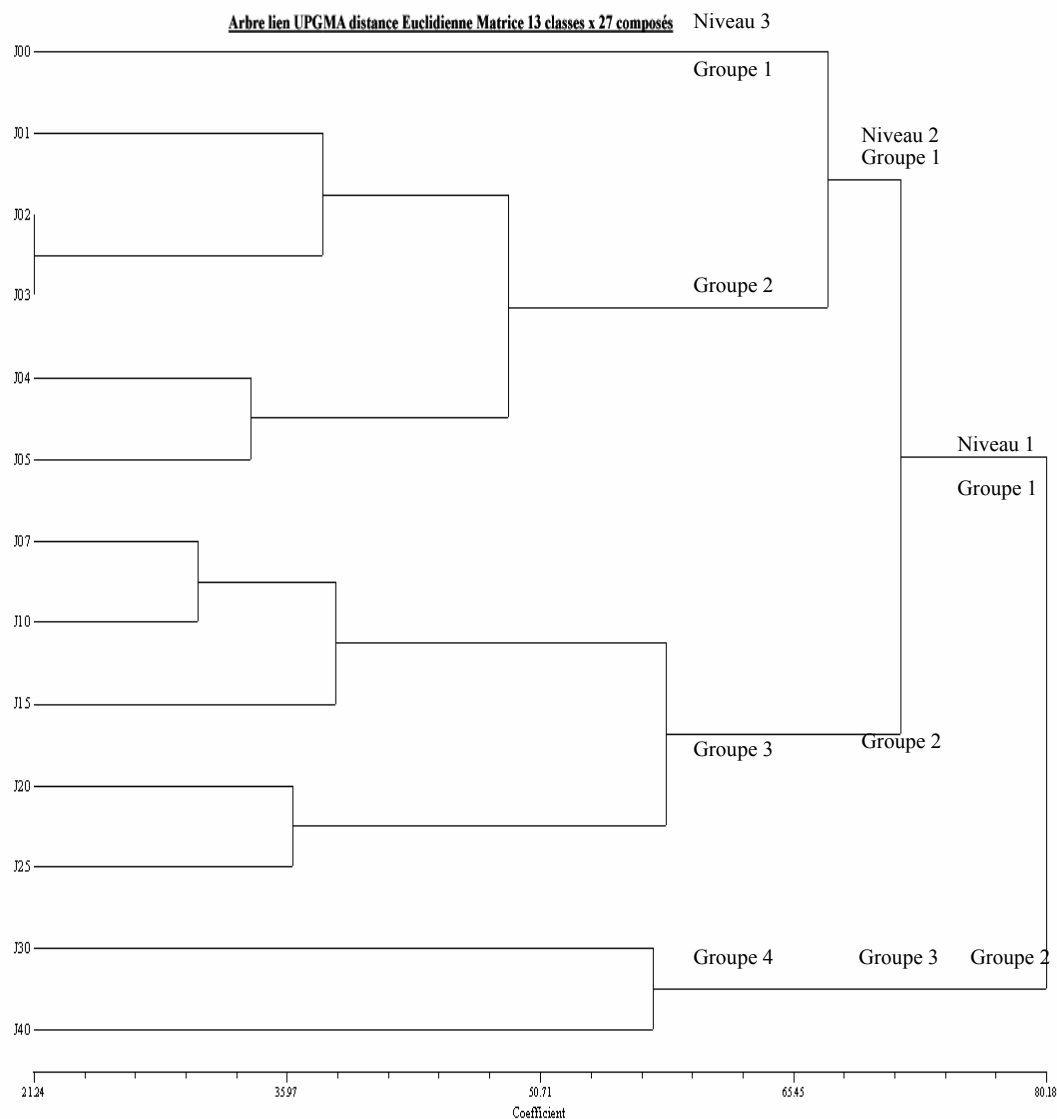


Figure 18. Dendrogramme UPGMA de la matrice de distance euclidienne calculée à partir de la matrice de Rang 13 classes x 27 composés.

Variables discriminantes des branchements majeurs (méthode Indval):

Niveau 1- Groupe 1 :

Seuil d'erreur = 5% : terpène (+), dihydrofarnesal (+), X7 (+), dihydrofarnesol (+), hénicosane (+), octadeca-9,12-dien-1-ol (-), tricos-9-ène (+), pentacos-9-ène (-), nonacos-9-ène (+).

Seuil d'erreur = 10% : dihydrofarnesyl dodecanoate (+), octadec-9-énal (+), hexadec-9-ényle acetate 2 (-), geranylcitronellol (+), hexacos-9-ène (+), hexacosane (-).

Niveau 2- Groupe 1 :

Seuil d'erreur = 5% : hénicosane (+).

Niveau 2- Groupe 2 :

Seuil d'erreur = 1% : dihydrofarnesyl dodecanoate (+).

Seuil d'erreur = 5% : X31 (+), X7 (-).

Niveau 3 -Groupe 1 :

Seuil d'erreur= 10% : icosane (+).

Niveau 3- Groupe 2 :

Seuil d'erreur = 10% : **octadec-9-énal (+).**

Niveau 3- Groupe 4 :

Seuil d'erreur NS à 10% : ethyl dodecanoate (+).

3.2.3.3. Analyse en composantes principales

La méthode de classification hiérarchique groupe entre eux les individus âgés de 7 à 25 jours. Une ACP est effectuée sur base de 48 molécules (car un des composés est absent chez tous les individus considérés ici : l'icosane) et des 44 individus âgés de 7 à 25 jours (fig. 19.).

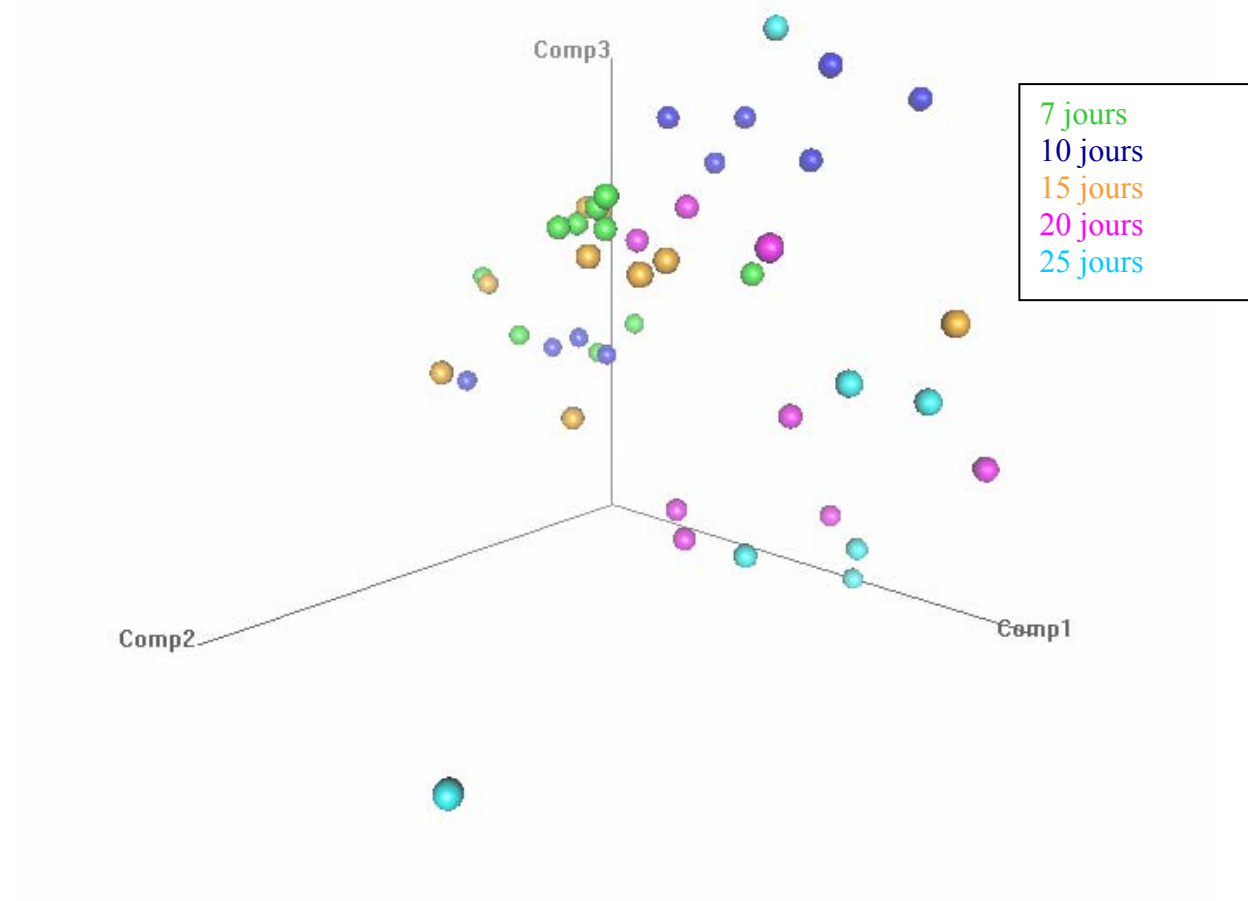


Figure 19. ACP en 3 dimensions. En vert les mâles âgés de 7 jours, en bleu foncé les mâles âgés de 10 jours, en orange les mâles âgés de 15 jours, en rose les mâles âgés de 20 jours et en bleu clair, les mâles âgés de 25 jours.

On peut remarquer qu'il existe un gradient dans la position des différents individus, dans l'ordre croissant d'âge.

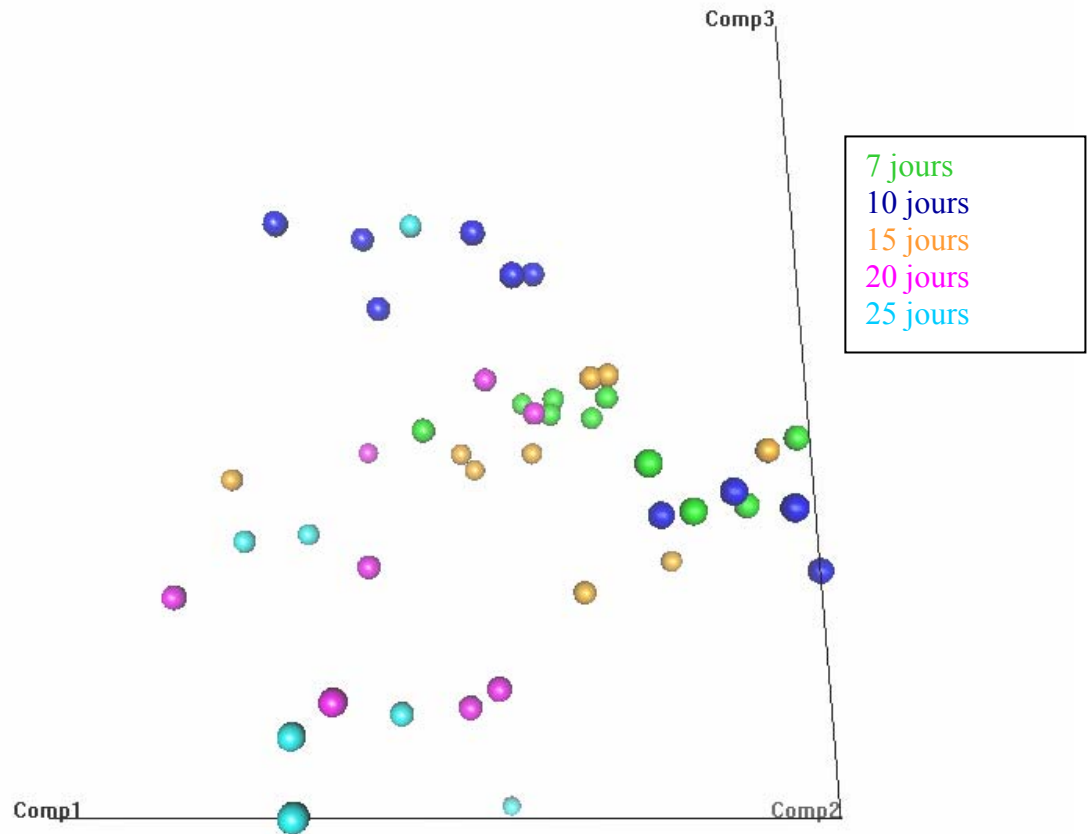


Figure 20. ACP en 3 dimensions, vue de la répartition des individus selon les axes 1 et 3. En vert les mâles âgés de 7 jours, en bleu foncé les mâles âgés de 10 jours, en orange les mâles âgés de 15 jours, en rose les mâles âgés de 20 jours et en bleu clair, les mâles âgés de 25 jours

Si l'on trace une diagonale entre les axes 1 et 3 les individus âgés de plus de 15 jours et les individus âgés de moins de 15 jours sont pratiquement tous séparés par cette droite.

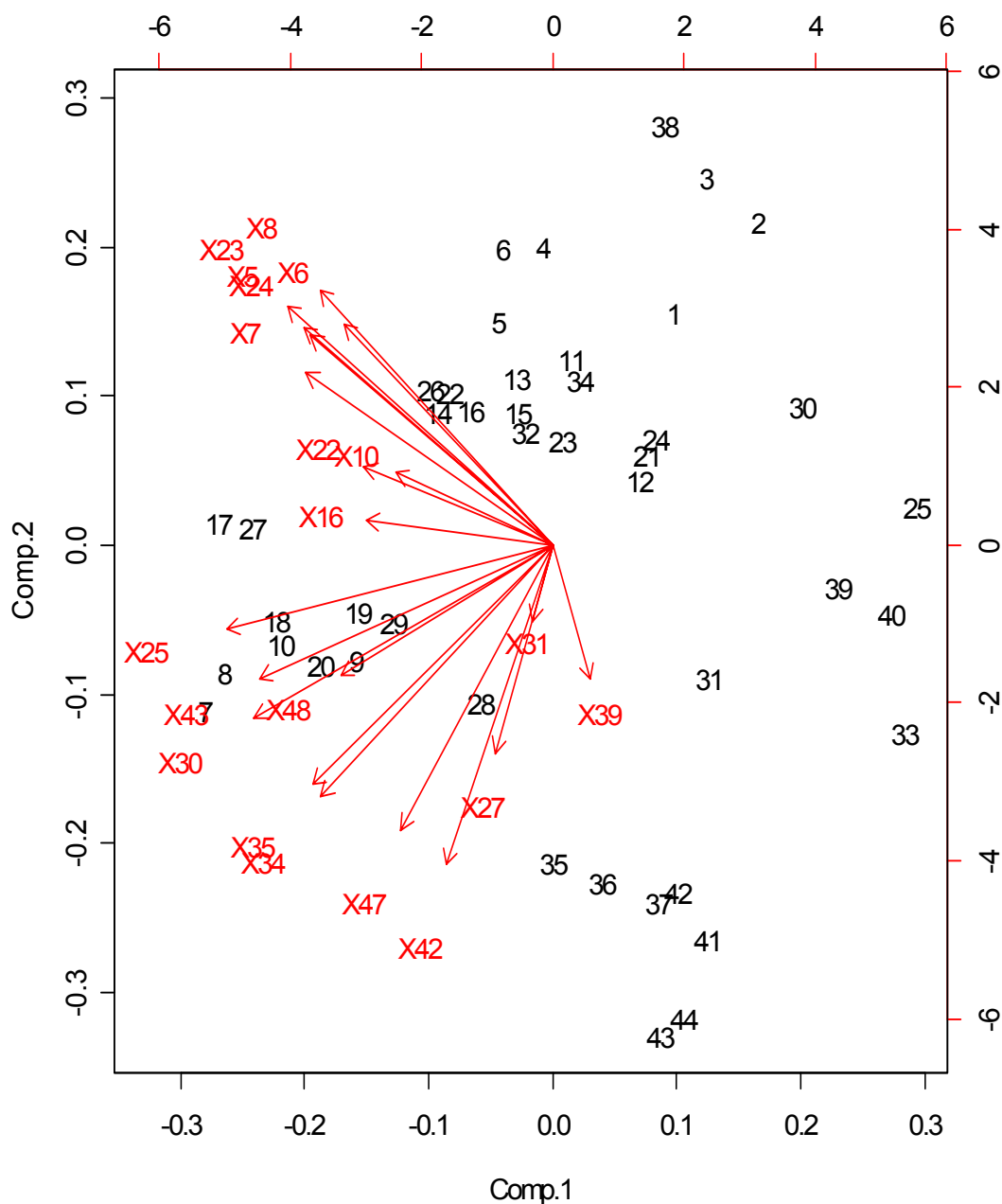


Figure 21. ACP en 2 dimensions, représentation des axes 1 et 2. 7 jours = 1 à 10, 10 jours = 11 à 20, 15 jours = 21 à 29, 20 jours = 30 à 37, 25 jours = 38 à 44.

Cette ACP permet d'isoler, selon les composantes 1 et 2, les individus âgés de 7 à 15 jours des autres. Les vecteurs qui ont de l'influence sur la position des plus jeunes individus sont : le dihydrofarnesol (X8), l'octadeca-9,12-dien-1-ol (X23), l'octadeca-9,12,15-trien-1-ol (X24), un terpène non identifié (X5), le dihydrofarnesol (X6) et le composé X7. Le vecteur qui influence la position des individus les plus âgés est l'heptacos-9-ene (X39).

3.2.4. Tableau récapitulatif

Ce tableau est effectué sur le calcul de la moyenne des aires des composés pour chaque classe. Chaque moyenne est pondérée (en %) par rapport à la somme des aires des moyennes de tous les composés pour chaque classe.

Tableau 7. Abondance moyenne des composés par classe d'âge

Classe d'âge	X1	alcène	ethyl dodecanoate	tetradecanal	terpène	dihydrofarnesal	X7	dihydrofarnesol	ethyl tetradec-9-enoate	ethyl tetradecanoate	hexadec-7-enal	hexadecanal	hexadec-9-en-1-ol	terpène?	hexadecan-1-ol	ethyl hexadec-9-enoate	hexadec-9-enyl acetate 1	X18	alcane	eicosane	hexadec-9-enyl acetate 2	octadec-9-enal	octadeca-9,12-dien-1-ol	octadeca-9,12,15-trien-1-ol	hénicosane	geranylcttronello
J00	+	1	+	+	+	1	1	2	+	1	+	+	+	+	+	1	1	+	+	1	1	1	+	+	4	+
J01	+	1	1	1	1	2	1	4	1	1	1	1	+	+	2	1	1	+	1	1	1	1	1	1	3	2
J02	+	+	+	1	1	2	1	4	1	1	1	1	+	+	2	+	+	+	+	+	1	1	2	2	3	3
J03	+	+	+	1	1	2	1	4	1	1	1	1	+	1	2	1	1	+	+	+	1	1	2	2	2	3
J04	+	+	+	2	1	2	1	4	1	1	1	1	+	1	2	1	1	+	+	+	1	1	2	2	2	3
J05	+	+	+	2	2	2	1	4	1	1	1	1	+	1	2	1	1	+	1	+	1	1	2	2	2	3
J07	+	+	+	1	2	2	1	4	1	1	1	1	+	1	2	1	1	+	1	+	1	1	2	2	2	3
J10	+	+	+	1	2	2	1	4	1	1	1	1	1	1	2	1	1	+	+	+	1	1	2	2	2	3
J15	+	+	+	2	2	2	1	4	1	1	1	1	+	1	2	1	1	+	1	+	1	1	2	2	2	3
J20	1	1	2	2	1	2	1	4	1	1	1	1	+	+	2	1	1	+	+	+	1	1	1	1	3	2
J25	+	+	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	1	+	1	1	1	+	1	+	1	1	1	1	2	1
J30	+	1	1	1	1	1	+	2	1	2	1	1	+	+	1	1	+	+	+	+	1	1	+	+	3	1
J40	+	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1	+	+	1	1	1	+	+	+	1	1	+	+	3	1

Classe d'âge	docosane	dihydrofarnesyl acetate	tricos-9-ene	tricosane	X31	tetracosane	tetracosane+icos-15-enyl acetate	pentacos-9-ene	pentacosane	terpène?	hexacos-9-ene	hexacosane	heptacos-9-ene 1	heptacosane 1	heptacos-9-ene 2	heptacosane 2	dihydrofarnesyl dodecanoate	nonacos-9-ene	dihydrofarnesyl tetradecanoate	cire 1	cire 2	cire 3	cire 4
J00	2	1	3	3	1	+	2	3	2	1	1	2	+	+	3	2	2	3	1	1	+	1	2
J01	1	1	3	3	1	+	1	2	2	1	1	1	+	+	2	1	1	2	1	1	1	1	1
J02	+	1	2	3	1	+	2	2	2	1	1	1	+	+	2	1	2	2	2	1	1	1	1
J03	1	1	2	3	+	+	1	2	2	+	1	1	+	+	2	1	3	1	2	1	1	1	1
J04	2	1	2	3	+	+	2	2	2	1	1	1	+	+	2	1	2	1	2	1	1	1	1
J05	1	1	2	3	+	+	1	1	2	1	1	1	+	+	2	1	2	1	1	1	1	1	1
J07	1	+	2	3	1	1	1	2	2	1	1	1	+	+	2	1	3	1	2	1	1	1	1
J10	1	1	2	3	+	+	1	2	2	1	1	1	+	+	2	1	2	1	2	1	1	1	1
J15	1	1	2	3	1	1	1	2	2	1	1	1	+	+	2	1	2	1	2	1	1	1	1
J20	1	1	2	2	1	+	1	2	2	+	1	1	+	+	3	1	3	2	2	1	1	1	1
J25	1	1	1	2	1	1	1	1	1	+	1	1	1	1	2	1	4	1	1	1	1	1	1
J30	2	1	2	4	+	+	1	2	3	+	1	1	+	+	3	2	3	2	2	1	1	1	1
J40	2	1	2	4	+	+	1	2	3	+	1	1	+	+	3	2	3	2	2	1	2	1	1

4 = composé majeur ; 3= aire > 5% ; 2= aire > 1% ; 1= aire >0,01% ; += aire <0,01%.

4. Discussion

4.1. Chromatogrammes

Dès les premières observations, les différentes classes d'âge peuvent être réunies en fonction de l'aspect général des chromatogrammes.

Chez les individus à peine émergés (0 jour), le dihydrofarnesol (terrestrol) n'est pas le pic le plus important en terme d'abondance relative (fig. 22.) alors qu'il est considéré comme une molécule fortement impliquée dans le processus de reconnaissance spécifique (Svensson, 1979).

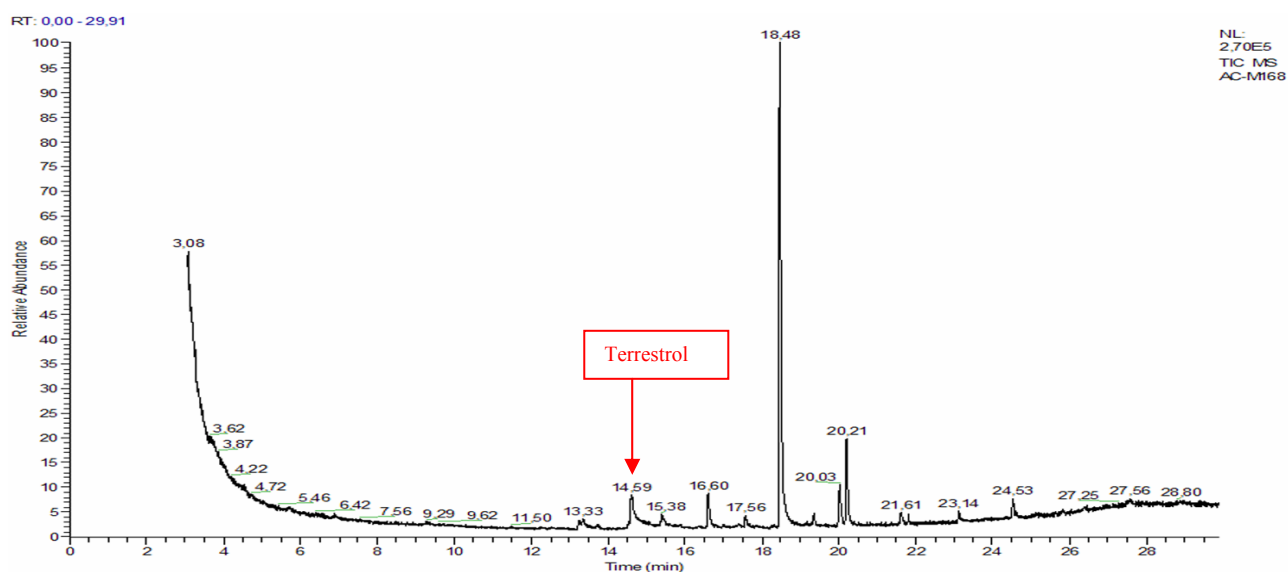


Figure 22. Chromatogramme représentatif des spécimens âgés de 0 jours. Le terrestrol est peu abondant.

A partir de l'âge de 1 jour, le terrestrol est plus abondant et devient le composé majeur (fig. 23).

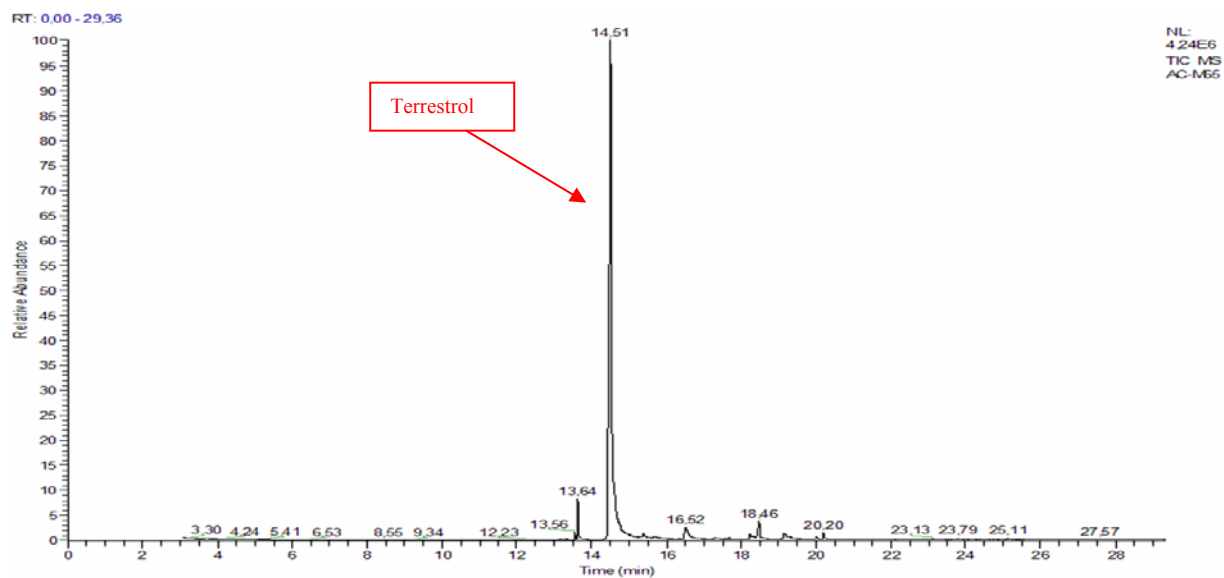


Figure 23. Chromatogramme représentatif des spécimens âgés de 1 jour. Le terrestrol est le composé le plus abondant.

Les chromatogrammes conservent le même aspect jusque l'âge de 15 jours (inclus). Ensuite les proportions entre les différents composés changent à nouveau.

Parmi les spécimens qui constituent la classe de 20 jours, certains conservent un chromatogramme typique alors que d'autres voient l'abondance relative du terrestrol diminuer fortement.

L'âge de 20 jours apparaît dès lors comme un âge critique (sénilité) chez les mâles de *B. terrestris*, âge à partir duquel leurs sécrétions des glandes labiales céphaliques perdent leur caractéristiques spécifiques. Cet âge est considéré comme l'âge normal de la mort des mâles en conditions naturelles (Svensson, 1980).

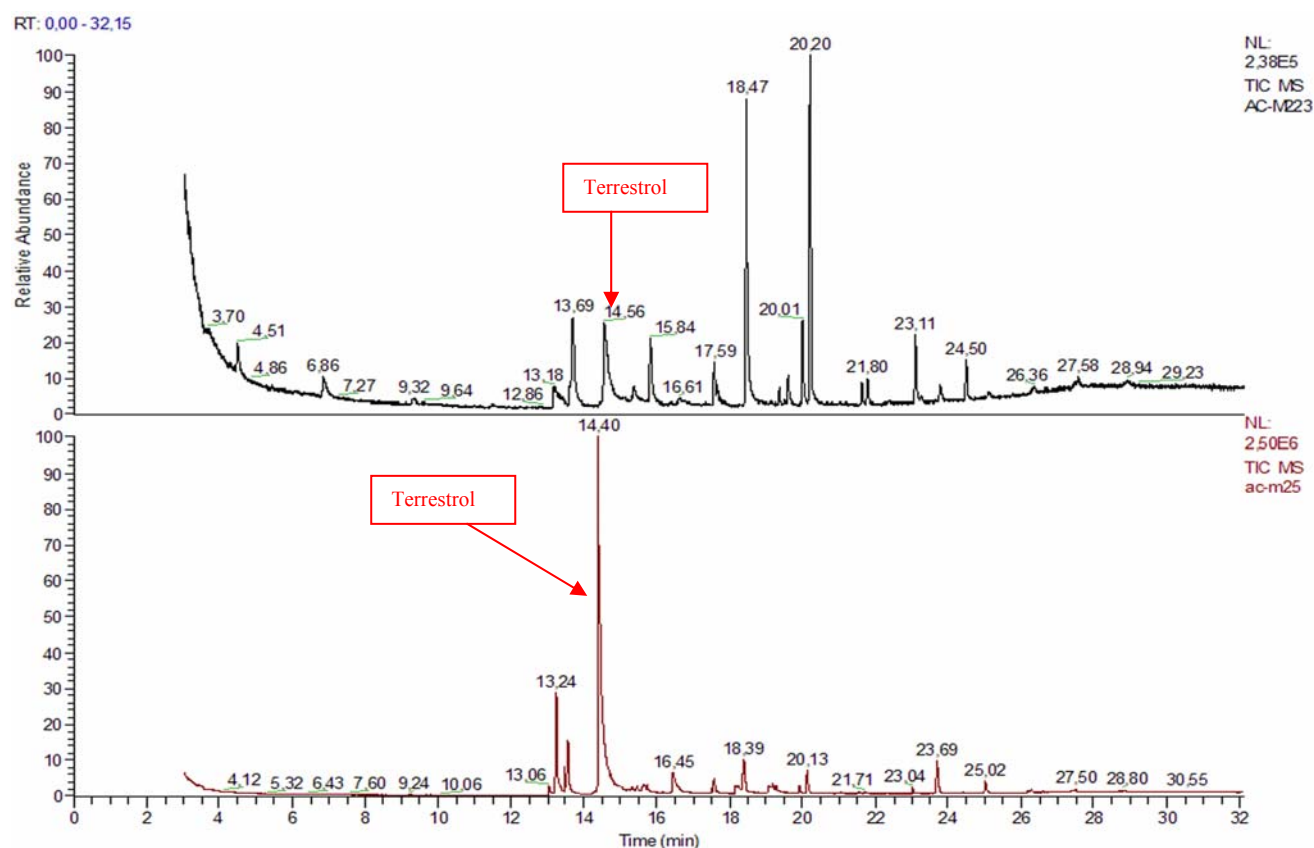


Figure 24. Deux chromatogrammes représentatifs des spécimens de la classe de 20 jours. Au dessus : spécimen pour lequel le terrestrol n'est pas le composé majeur. En-dessous : spécimen pour qui le terrestrol est le composé majeur

A l'âge de 25 jours et plus, le terrestrol n'est plus jamais le composé majeur. Lorsqu'il est détecté, on le trouve qu'à l'état de trace. Cet âge est supérieur à l'âge probable de la mort des bourdons en conditions naturelles.

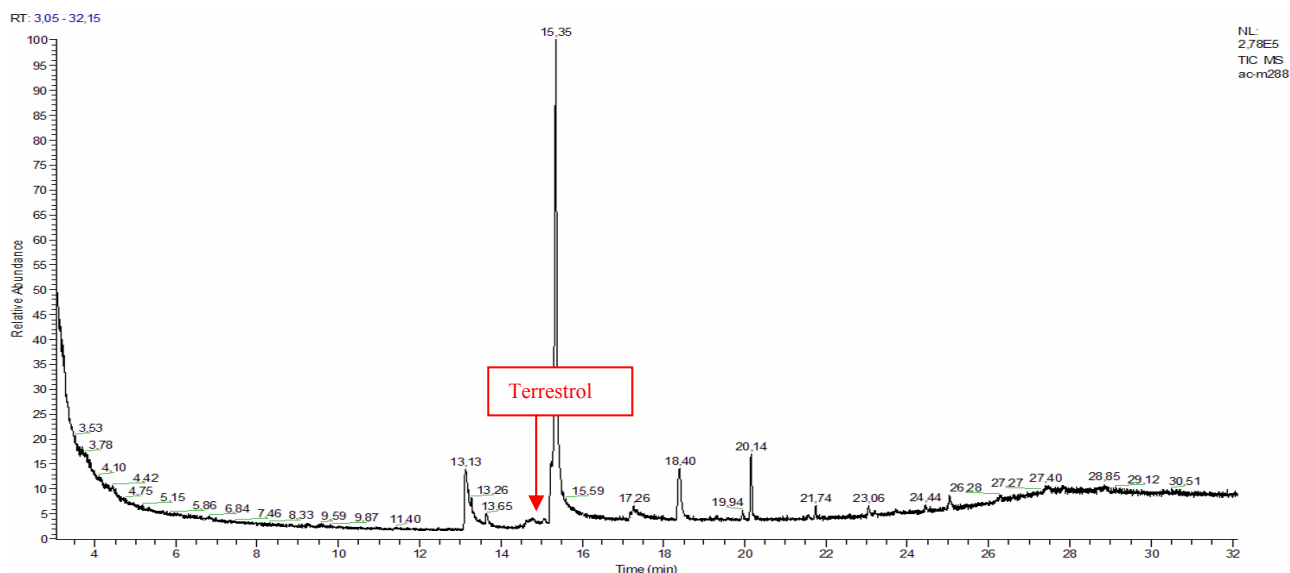


Figure 25. Chromatogramme représentatif des spécimens âgés de 25 à 40 jours. Le terrestrol est à l'état de trace.

L'allure des chromatogrammes permet de faire une première approximation sur l'âge des bourdons étudiés. Lorsque la molécule spécifique à l'espèce est le composé majeur, l'âge du bourdon se situe entre 1 et 20 jours. Lorsque la molécule spécifique n'est pas le composé majeur, l'animal est soit trop jeune (0 jours), soit sénile (20 à 40 jours).

Il faut noter que ce phénomène a été observé par Terzo *et al.* (2005), une partie des *B. ruderarius* étudiés alors étaient caractérisés par l'absence du composé majeur.

4.2. Identification des composés

Presque tous les composés identifiés dans cette étude sont déjà connus comme étant des molécules constitutives des sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. terrestris*. Les composés « X1 », « X7 », « X18 » et « X31 » n'ont pas pu être identifiés.

Tableau 8. Comparaison entre les molécules identifiées dans le cadre de ce travail et Bergman (1997)

	Molécules identifiées		
		X25	hénicosane
X1	non identifiée	X26	geranylcitronellol
X2	alcène	X27	docosane
X3	ethyl dodecanoate	X28	dihydrofarnesyl acetate
X4	tetradecanal	X29	tricos-9-ène
X5	non identifiée (terpène)	X30	tricosane
X6	dihydrofarnesal	X31	non identifiée
X7	non identifiée	X32	tetracosane
X8	terrestrol (dihydrofarnesol)	X33	tetracosane+ icos-15-enyl acetate
X9	ethyl tetradec-9-énoate	X34	pentacos-9-ène
X10	ethyl tetradecanoate	X35	pentacosane
X11	hexadec-7-enal	X36	non identifiée (terpène)
X12	hexadecanal	X37	hexacos-9-ène
X13	hexadec-9-en-1-ol	X38	hexacosane
X14	non identifiée (terpène)	X39	heptacos-9-ène
X15	hexadecan-1-ol	X40	heptacosane
X16	ethyl hexadec-9-énoate	X41	octacosène
X17	hexadec-9-enyl acetate 1	X42	octacosane
X18	non identifiée	X43	dihydrofarnesyl dodecanoate
X19	alcane	X44	nonacos-9-ène
X20	icosane	X45	dihydrofarnesyl tetradecanoate
X21	hexadec-9-enyl acetate 2	X46	cire 1
X22	octadec-9-enal	X47	cire 2
X23	octadeca-9,12-dien-1-ol	X48	cire 3
X24	octadeca-9,12,15-trien-1-ol	X49	cire 4

En grisé, les molécules citées par Bergman.

Bergman (1997) dressent une liste des composés connus pour faire partie des sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. terrestris*. Elle en contient 23 (tab. 1.).

Dans le présent travail, 49 composés ont été identifiés. Sur les 23 molécules citées par Bergman 16 sont confirmées ici. Par contre, le geranylcitronellal, l'isopropyl dodecanoate, le tetradecanal ; l'isopropyl tetradecanoate, l'icosanol, l'icosenol et le docosenol ne sont pas détectés dans le présent travail.

D'après Bergström *et al.* la molécule majeure de la phéromone sexuelle de *B. terrestris* est le terrestrol, c'est ce que l'on peut également observer dans le tableau 5. (moyenne des aires par classe d'âge, en %) pour les spécimens âgés de 1 à 20 jours. Les bourdons de 0 jours sont caractérisés par la présence de l'hénicosane comme molécule majeure, pour les spécimens âgés de 25 jours, c'est le dihydrofarnesyl dodecanoate qui est le plus abondant et enfin, pour les mâles âgés de 30 et 40 jours, le composé majeur est le tricosane.

4.3. Distinction des classes

L'ADL pratiquée sur les 13 classes d'âges ne permet pas de distinguer avec exactitude l'appartenance d'un individu à une classe. En effet le classement d'un individu s'effectue avec +/- 20% d'erreur (taux global de séparation des groupes). Malgré cela, chaque classe forme un nuage de point condensé. Les différents nuages de points se recouvrent partiellement, cela est dû à la présence d'un continuum d'âge dans la série d'analyse. Habituellement, lorsqu'on étudie les sécrétions des glandes labiales céphaliques la comparaison s'effectue entre plusieurs espèces ou sous-espèces et non pas entre individus conspécifiques, les différences sont alors plus notables.

L'ADL pratiquée sur base des 4 classes d'âges basées sur les phases de vie (Ågren, 1979; Svensson, 1980) permet des interprétations plus cohérentes. Dans ce cas, les 4 groupes sont très bien séparés et forment des nuages compacts. Un léger recouvrement des différents groupes est observable et certainement lié au continuum qui existe dans la série de données. 96% des individus sont reclassés correctement lorsqu'on effectue une matrice de confusion.

La méthode de groupement UPGMA de la matrice de distance euclidienne basée sur la matrice de rang donne des résultats cohérents avec le choix des 4 classes inspirées par la littérature et utilisées pour l'ADL de 4 groupes. La classe des individus âgés de 0 jour est à nouveau isolée des autres. Le deuxième groupe est constitué des individus âgés de 1 à 5 jours, le troisième comprend les classes de 7 à 25 jours et les deux dernières classes, 30 et 40 jours sont liées. La plus grande distance sépare les individus âgés de tous les autres. Grâce à la méthode IndVal, on peut déterminer quels sont les composés dont la surface des pics (transformée ici en rang) permet la séparation des groupes. Le décalage entre les groupes inspirés par la littérature et ceux obtenus par la méthode de groupement s'explique par les conditions d'élevage. En effet, les mâles survivent plus longtemps en élevage (plus de 40 jours) que dans les conditions naturelles (3 à 4 semaines d'après Svensson (1980)). La classe constituée des mâles âgés de 30 à 40 jours est donc un artéfact et correspond dans la nature à des bourdons séniles âgés probablement de 20 et 25 jours (tab. 9.).

Tableau 9. Correspondance entre les classes d'âge issues de la littérature et les classes d'âge obtenue par méthode de groupement

Etat	Ågren et Svensson (âge en jours)	Présente étude (âge en jours)
Emergence	0	0
Vie intranidale	1 à 4	1 à 5
Période d'activité sexuelle extranidale	5 à 15	7 à 25
Sénilité	20 à 25	30 à 40

Les classes obtenues par la méthode de groupement sont cohérentes avec un grand nombre d'observations effectuées par différents auteurs. Tout d'abord, Svensson (1980) estime que les mâles de bourdons vivent de 3 à 4 semaines ce qui est effectivement observé ici. La parade sexuelle de *B. confusus* Schenck a été observée pendant 2 à 26 jours après que les mâles aient été marqués par Kindl *et al.* (1999). Cela correspond à peu près à la durée de la période d'activité sexuelle extranidale obtenue ici par la méthode de groupement. Enfin, d'après Duvoisin *et al.* (1999), l'aptitude des mâles à se reproduire dépend de plusieurs facteurs tels que l'âge, la luminosité et le moment de la journée. Ils sont aptes à s'accoupler à l'âge de 16 +/- 7 jours (Duchateau & Mariën, 1995). Cette période correspond au groupe formé par les individus âgés de 7 à 25 jours dans la présente analyse.

Finalement, l'ACP effectuée sur le groupe de mâles âgés de 7 à 25 jours montre une nouvelle distinction au sein de ce groupe. Les deux premières composantes de l'ACP discriminent les individus de 20 et 25 jours des autres. Pour les plus jeunes individus, ces deux composantes sont fortement corrélées avec les composés suivants : un terpène non identifié , le dihydrofarnesal , X7, le dihydrofarnesol , l'octadeca-9,12-dien-1-ol et octadeca-9,12,15-trien-1-ol. Pour les individus les plus âgés, ces deux composantes sont corrélées avec un seul composé : l'heptacos-9-ène 1. Les plus vieux individus de ce groupe ne sont donc pas directement liés à la présence du composé majeur. Il est donc probable que les individus observés par Terzo *et al.* (2005) qui ne possèdent pas de pics qui correspondent à la molécule spécifique sont des individus très âgés.

4.4. Comparaison des résultats avec les observations d'Ågren

Avant 1 jour $\frac{1}{2}$, Ågren *et al.* n'observent aucune preuve de l'activité sécrétrice : la lumière des acini est vide et les cellules ne contiennent pas de vésicules de sécrétion. Cela correspond aux résultats statistiques obtenus puisque les individus âgés de 0 jours sont toujours fortement isolés des autres.

L'activité sécrétrice n'est histologiquement observée par Ågren *et al.* qu'à partir du premier jour, et elle s'installe complètement entre 2 et 4 jours. Statistiquement, ces groupes sont effectivement liés les uns aux autres par l'ADL sur base de 4 classes et par la méthode de groupement.

Entre 5 et 25 jours, l'activité sécrétrice continue, les glandes se remplissent et le bourdon marque activement sur son circuit de patrouille. On retrouve ce groupe (sans la classe de 5 jours) dans la méthode de groupement.

A 40 jours, les glandes sont en phase de dégénérescence, il reste des sécrétions dans les cellules, mais le noyau est pycnotique et ne commande donc plus la synthèse de nouvelles sécrétions. Les individus de 30 et 40 jours sont groupés ensemble dans le dendrogramme présenté ici (fig. 18.) et il n'y a pas de composés qui les caractérise de manière significative. Cet état est aussi remarquable dans les chromatogrammes car le composé majeur est soit inexistant, soit présent en très faible quantité.

4.5. Mise en place des voies métaboliques

Il faut noter qu'il n'y a apparemment pas mise en place d'une voie métabolique avant l'autre. En effet, même chez les très jeunes mâles (0 jours), on trouve des composés qui appartiennent aux deux familles moléculaires, dérivés d'acide gras et de la mévalogénine (tab. 10.). On peut néanmoins constater que les proportions de molécules de ces deux familles varient largement.

Tableau 10. Comparaison de la somme des surfaces moyennes par classe d'âge des dérivés d'acide gras et de l'acide mévalogénique

Classe d'âge	J00	J01	J02	J03	J04	J05	J07	J10	J15	J20	J25	J30	J40
Dérivés d'acide gras													
Somme des surfaces (%)	90,24	45,73	37,84	38,58	38,45	32,89	33,78	33,64	35,28	48,17	17,37	86,62	86,59
Dérivés d'acide mévalogénique													
Somme des surfaces (%)	6,41	52,84	60,77	60,36	60,76	66,66	65,67	65,99	64,12	48,86	81,89	11,24	10,71

4.6. Implications

Les caractères chimiques doivent jouer un rôle décisif dans la systématique moderne (Cane, 1983). Lors de l'étude de la composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques d'une espèce, il faut donc tenir compte de la variation de la composition avec l'âge. Les individus qui possèdent des chromatogrammes « anormaux », comme ceux observés par Terzo *et al.* (2005), chez qui la molécule majeure est absente doivent être écartés de l'interprétation du SMRS au sens de Paterson (1993). En effet, la composition des sécrétions des glandes labiales

céphaliques joue un rôle lorsque les mâles sont actifs sexuellement or, il apparaît que les mâles chez qui la molécule majeure est absente et qui sont âgés de telle manière qu'ils pourraient être capturés dans la nature (pas avant 4 jours) sont des individus âgés dont l'activité sexuelle est très probablement éteinte. Si l'on veut dresser une liste des molécules qui constituent les sécrétions des glandes labiales céphaliques, il est préférable de ne tenir compte que des individus en période d'activité sexuelle et donc d'éliminer les sujets chez qui la molécule majeure n'est pas le composé principal en terme d'abondance relative.

5. Conclusions

5.1. Synthèse des composés

Comme on peut le constater dans le tableau récapitulatif (tab. 7.) l'abondance relative de certains composés augmente avec l'âge : le dihydrofarnesal, le terrestrol, l'hexadecan-1-ol, l'octadeca-9, 12-dien-1-ol, l'octadeca-9,12,15-trien-1-ol, le geranylcitronellol, le pentacosane et le dihydrofarnesyl tetradecanoate. Il y a donc une progression dans la synthèse des différents composés. L'augmentation de l'abondance des molécules citées ci-dessus s'effectue à partir de l'âge de 1 ou 2 jours. On remarque aussi une diminution de l'abondance de la plupart de ces molécules à partir de l'âge de 20 jours.

Le terrestrol, considéré comme le composé spécifique de l'espèce étudiée, a probablement une influence dans la composition du bouquet phéromonal : il est non seulement absent chez les individus les plus jeunes et les plus âgés, mais c'est aussi un des composés qui permet la distinction des spécimens âgés de plus et moins de 15 jours durant la période de vie extranidale.

5.2. Variabilité avec l'âge

La composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques varie clairement avec l'âge des spécimens. La molécule spécifique ne devient le composé majeur qu'à partir du premier jour après l'émergence. D'autres composés, comme l'icosane ne sont présents en quantité plus importante (surface du pic > 1%) qu'au cours des premiers et derniers jours de la vie.

La variabilité des sécrétions est telle qu'on peut reclasser un mâle dont on connaît la composition des sécrétions dans une des 4 classes d'âges (0, 1 à 4, 5 à 15 et 30 à 40 jours) en faisant moins de 5% d'erreur.

On peut déduire de cela qu'un mâle capturé dans la nature et qui présente un spectre dans lequel la molécule spécifique n'est pas le composé majeur est probablement un vieux mâle.

5.3. Voies métaboliques

La mise en place des deux voies métaboliques s'effectue de concert dès l'émergence.

6. Bibliographie

- Ågren L., Cederberg B. & Svensson Bo G., 1979. Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae). *Zoon* 7: 1-14.
- Ayasse M., Paxton R. J., & Tengö J., 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 46: 31-78
- Bergman P., 1997. *Chemical communication in bumblebee premating behaviour*. Ph-D Thesis, Department of Chemical Ecology. Göteborg University, Göteborg.
- 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., Svensson Bo G., Appelgren M. & Groth I., 1981. Complexity of bumble bee marking pheromones: biochemical, ecological and systematical interpretations. *Systematics Association* special volume 19: 175-183.
- Calam D. H., 1969. Species and Sex-specific Compounds from the Heads of Male Bumblebees (*Bombus* spp.). *Nature* vol. 221: 856-857.
- Cane J. H., 1983. Chemical evolution and chemosystematics of the Dufour's gland secretions of the lactone-producing bees (Hymenoptera: Colletidae, Halictidae and Oxaeidae). *Evolution*, 37 (4): 657-674.
- Cederberg B., Svensson Bo G., Bergström G., Appelgren M. & Groth I. 1984. Male marking Pheromones in North European Cuckoo Bumble Bees *Psithyrus* (Hymenoptera, Apidae). *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis, Ser. V: C.*, 3: 161-166.
- 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 pp.
- Duchateau M. J. & Märien J. 1995. Sexual biology of haploid and diploid males in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Insectes sociaux*, 42 : 255-266.
- Dufrêne M. & Legendre P., 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67: 345-366.
- Duvoisin N., Baer B. & Schmid-Hempel P., 1999. Sperm transfer and male competition in a bumblebee. *Animal Behaviour*, 58: 743-749.
- Escoufier Y., 1970. Echantillonnage dans une population de variables aléatoires réelles. *Publication de l'Institut de Statistique de l'Université de Paris*, 19:1-47.
- Kindl J., Hovorka O., Urbanova K. & Valterova I., 1999. Scent marking in male premating behavior of *Bombus confusus*. *Journal of Chemical Ecology*, 25, n°7 : 1489- 1500.
- Kullenberg B., Bergström G. & Stållberg-Stenhagen S. 1970. Volatile Components of the Cephalic Marking Secretion of Male Bumble Bees. *Acta Chemica Scandinavica*, 24(4) : 1481-1483.

- Kullenberg B., Bergström G., Bringer B., Calberg B. & Cedreberg B., 1973.** Observations on scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. Males (Hym., Apidae) and localization of sites of production of the secretion. *Zoon*, Suppl. 1:23-29
- Lanne B. S., Bergström G., Wassgren A.-B. & Törnback B., 1987.** Biogenetic pattern of straight chain marking compounds in male bumble bees. *Comparative biochemistry and physiology*, 88B, 2: 631-636.
- R Development Core Team, 2004.** *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rholf F. J., 1993.** *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80*. Applied biostatistic Inc., New York, 241 + VII.
- Paterson H. E. H., 1993.** *Evolution and the recognition concept of species*, The Johns Hopkins University Press, 234 pp.
- Regali A., 1996.** *Contribution à l'étude des besoins alimentaires en stéroïdes de Bombus terrestris (L.)*. Thèse de doctorat, Université de Mons-Hainaut, Mons, 143 + 29 pp.
- 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 bumble bees (Hymenoptera, Apidae)*. Ph-D Thesis, Department of Entomology. Uppsala University, Uppsala: 42 pp.
- Terzo M., Valterova I., Urbanova K. & Rasmont P., 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. *Phytoprotection* 84 : 39-49.
- Terzo M., Urbanova K., Valterova I. & Rasmont P., 2005.** Intra and interspecific variability of the cephalic labial glands' secretions in male bumblebees: the case of *Bombus (Thoracobombus) ruderarius* (Müller) and *B. (Thoracobombus) sylvarum* (L.) [Hymenoptera, Apidae]. *Apidologie* 36: 85-96.
- Terzo M., Copens P., Valterova I., Toubreau G. & Rasmont P., in prep.** Absence of sexual marking pheromones production in male bumble bee species of the subgenus *Rhodobombus* Dalla Torre (Hymenoptera, Apidae, *Bombus* Latreille): morphological, chemical and behavioural evidences. *Insectes sociaux*, 15 pp.
- Tomassone R., 1988.** *Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle discriminante ?*, ITCF, 56pp.

7. Annexes

Annexe 1.

Script utilisé pour la LDA dans R

```
edit(AS)
# S'il y a une colonne 'X' au début
AS <- AS[, -1]
#standardisation et transformations
AS.l <- log1p(AS[, 1:49])# Log
edit(AS.l)
# - moyenne / ecart-type
# ecart-type
AS.ls <- apply(AS.l, 2, scale)
invisible(edit(AS.ls))
#moyenne
AS.ls.mean <- apply(AS.ls, 2, mean)
AS.ls.mean

# Rajout des classes après standardisation
AS. <- as.data.frame(AS.ls)
AS. <- cbind(AS., species = AS[, 50])
names(AS.)

# Analyse lda
library(MASS)
AS.lda <- lda(species ~ ., data=AS.)
AS.lda
plot(AS.lda)
# Valeurs propres- coord des objet sur les axes
(AS.ind <- predict (AS.lda, dimen = 4))
# Matrice de confusion sur l'ensemble
AS.conf <- table(predicted=AS.ind$class, observed=AS$species)
AS.conf
# Taux global de séparation des groupes
sum(diag(AS.conf)) / sum(AS.conf) * 100

# Graphe en 3D des 3 premiers axes de la LDA
(AS.ind3 <- predict (AS.lda, dimen = 3))
coord3D <- AS.ind3$x[, 1:3]
coord3D <- as.data.frame(coord3D)
coord3D$species <- AS$species
scatter3d(coord3D$LD1, coord3D$LD3, coord3D$LD2, group=coord3D$species, surface=FALSE, bg="white",
grid=FALSE, xlab="LD1", ylab="LD3", zlab="LD2")
```

Annexe 2.

Script utilisé pour l'ACP avec Escoufier dans R

```
edit(AS)

#standardisation et transformations
AS.l <- log1p(AS [2:49])# Log
edit(AS.l)
# - moyenne / ecart-type
# ecart-type
AS.ls <- apply(AS.l, 2, scale)
invisible(edit(AS.ls))
#moyenne
AS.ls.mean <- apply(AS.ls, 2, mean)
AS.ls.mean
edit(AS.ls.mean)

#Escoufier
library (pastecs)
AS.ls.esc <- escouf(AS.ls)
plot(AS.ls.esc)
sumAs <- AS.ls[, c(17, 32, 7, 27, 4, 36, 20, 22, 28, 1, 8, 40, 41, 12)]# selection des variables pour ACPmary(AS.ls.esc)
AS <- AS.ls[, c(17, 32, 7, 27, 4, 36, 20, 22, 28, 1, 8, 40, 41, 12)]# selection des variables pour ACP
edit(AS)

#ACP
library(MASS)
(AS.pc <- princomp (AS.ls, cor = TRUE))
summary(AS.pc)
plot(AS.pc)
biplot(AS.pc, choices=c(1,2))

# calcul de la variance expliquée
AS.pc$sdev^2
(contrib <- AS.pc$sdev^2/sum (AS.pc$sdev^2)*100)##%
barplot (contrib)#graph des %
cumsum (contrib)## % de la variance cumulés

#Projection des individus sur les axes
(AS.ind <- predict (AS.pc))#coordonnées des individus
plot(AS.ind[, 1], AS.ind[, 2], col = as.numeric(AS$species))
#Espace des variables
(AS.ld = loadings (AS.pc))#coefficients qui permettent de projeter les axes

# Graphe en 3D des 3 premiers axes de l'ACP
(AS.ind3 <- predict (AS.pc, dimen= 3))
coord3D <- AS.ind3[, 1:3]
coord3D <- as.data.frame(coord3D)
edit(coord3D)
coord3D$species <- AS$species
scatter3d(coord3D$Comp.1, coord3D$Comp.2, coord3D$Comp.3, group=coord3D$species, surface=FALSE,
bg="white", grid=FALSE, xlab="LD1", ylab="LD3", zlab="LD2")
```