

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE
-
FACULTE DES SCIENCES
-
UNIVERSITE DE MONS- HAINAUT

**Caractérisation de la variabilité intraspécifique des
sécrétions des glandes labiales céphaliques de
Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae)**

Promoteur : Prof. P. Rasmont

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

Année académique 2005-2006

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.

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.

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. La communication chimique	1
1.2. Primers Vs releasers	3
1.2.1. Phéromones d'alarme	4
1.2.2. Phéromones de piste	6
1.2.3. Phéromones de marquage territorial	6
1.2.4. Phéromones de reconnaissance interindividuelles	6
1.2.5. Phéromones sexuelles	7
1.2.6. Phéromones d'agrégation	8
1.2.7. Phéromones d'espacement	8
1.3. Modèle biologique	9
1.4. La notion d'espèce	11
1.5. Le SMRS des bourdons	12
1.6. Les sécrétions des glandes labiales céphaliques	14
1.7. Variations des sécrétions des glandes labiales céphaliques	17
1.8. La chémotaxonomie	18
1.9. Objectifs	19
2. Matériel et méthode	20
2.1. Matériel biologique	20
2.1.1. <i>Bombus terrestris ferrugineus forme terrestris</i>	21
2.1.2. <i>Bombus terrestris ferrugineus forme lusitanicus</i>	22
2.1.3. <i>Bombus terrestris sassaricus</i>	23
2.1.4. <i>Bombus terrestris dalmatinus</i>	23
2.2. Dissection des glandes céphaliques labiales	25
2.2.1. Technique de dissection	25
2.2.2. Conservation des glandes	25
2.3. Analyse chimique	26
2.4. Analyse statistique	28
2.4.1. Constitution de la matrice	28
2.4.2. Analyse en composantes principales (ACP)	29
2.4.3. Analyse discriminante linéaire (ADL)	30
2.4.4. Classification hiérarchique	30
2.4.4.1. Rpratt dans R	30
2.4.4.2. NTSys	30
3. Résultats	31
3.1. Analyse par GC-MS	31
3.2. Analyses statistiques	36
3.2.1. Analyse en composante principale (ACP)	36
3.2.1.1. Diminution du nombre de variables par la technique d'Escoufier	36
3.2.1.2. Résultats de l'analyse en composante principale	37
3.2.2. Analyse discriminante linéaire (ADL)	39
3.2.3. Méthode de groupement hiérarchique	41
3.2.3.1. Rpratt dans R	41
3.2.3.2. NTSys	42
4. Discussion	44
4.1. Chromatogrammes	44
4.2. Analyses statistiques	44
5. Conclusion	47

6. Perspectives.....	48
7. Annexes.....	49
7.1. Annexe 1. : Script pour effectuer l'ACP avec le logiciel R.	49
7.2. Annexe 2. : Script pour effectuer l'ADL avec le logiciel R.....	51
8. Bibliographie.....	55

1. Introduction

1.1. La communication chimique

Pour survivre et se reproduire, les êtres vivants doivent pouvoir échanger des informations au sujet du milieu dans lequel ils évoluent, de l'état physiologique dans lequel ils se trouvent, de l'apparition d'un danger, ... qu'ils appartiennent à la même espèce ou à des espèces différentes. Ils peuvent ainsi trouver leur nourriture, échapper à un danger, choisir un conjoint, retrouver un lieu de ponte, assumer leur position sociale, ...

L'olfaction est la forme la plus primitive et la plus répandue des perceptions sensorielles, on la retrouve chez de nombreux organismes, des plus simples aux plus complexes, des spongiaires aux primates (Cassier *et al.*, 2000 ; Wilson, 1974). On distingue différents types de signaux chimiques. Les plus répandus sont, selon leur fonction, les signaux d'alarme, les signaux sexuels, les signaux parentaux et les signaux sociaux (Cassier *et al.*, 2000).

La communication chimique possède de nombreux avantages par rapport aux autres modalités sensorielles que sont la communication auditive, la communication tactile, la communication visuelle et la communication électrique.

Avantages et désavantages de la communication chimique d'après Wilson (1974):

Avantages:

- Elle se transmet dans l'obscurité;
- Elle contourne les obstacles;
- De faibles quantités émises sont suffisantes pour pouvoir perpétrer le signal pendant plusieurs heures voire plusieurs jours;
- Sa biosynthèse est économique;
- Son émission est simple (ouverture d'un réservoir);
- Elle couvre la plus grande étendue potentielle de tous les types de signaux utilisés;
- Elle peut être transmise à très courte ou longue distance ; avec une durée de persistance potentielle très grande;

- Utilisée comme borne ou piste odorante, elle a la capacité de transmettre son message dans le futur (l'auteur du signal a l'occasion de revenir et de l'utiliser ultérieurement).

Désavantages:

- Sa transmission et son extinction sont lentes;
- Elle est diffusée ou transportée par un courant;
- Il n'est pas possible de passer sans transition d'un message à un autre;
- Il n'existe pas de phéromone susceptible de transmettre des changements rapides (contrairement à la vue ou à l'ouïe);
- Il n'y a pas de transfert d'information par modulation de fréquence ou d'amplitude, ce qui entraîne une multiplication du nombre de glandes.

La chémoréception est rendue possible par l'émission de molécules informatives, volatiles ou dissoutes, dépourvues de toute valeur nutritionnelle (Cassier *et al.*, 2000). Ces molécules impliquées dans l'olfaction appartiennent à 2 grands groupes (fig. 1.): les phéromones qui interviennent dans les réactions intraspécifiques et les composés allélochimiques qui participent aux réactions interspécifiques. Parmi ces derniers on distingue les allomones qui ont un rôle bénéfique pour l'émetteur (défense) et les kairomones qui ont un rôle bénéfique pour l'individu récepteur (localisation de l'hôte par des prédateurs...). Les synomones présentent un avantage réciproque et les apneumones sont émises par un matériel non vivant.

Au sein des phéromones on distingue les phéromones incitatrices ou *releasers* et les phéromones modificatrice ou *primers* (Cassier *et al.*, 2000).

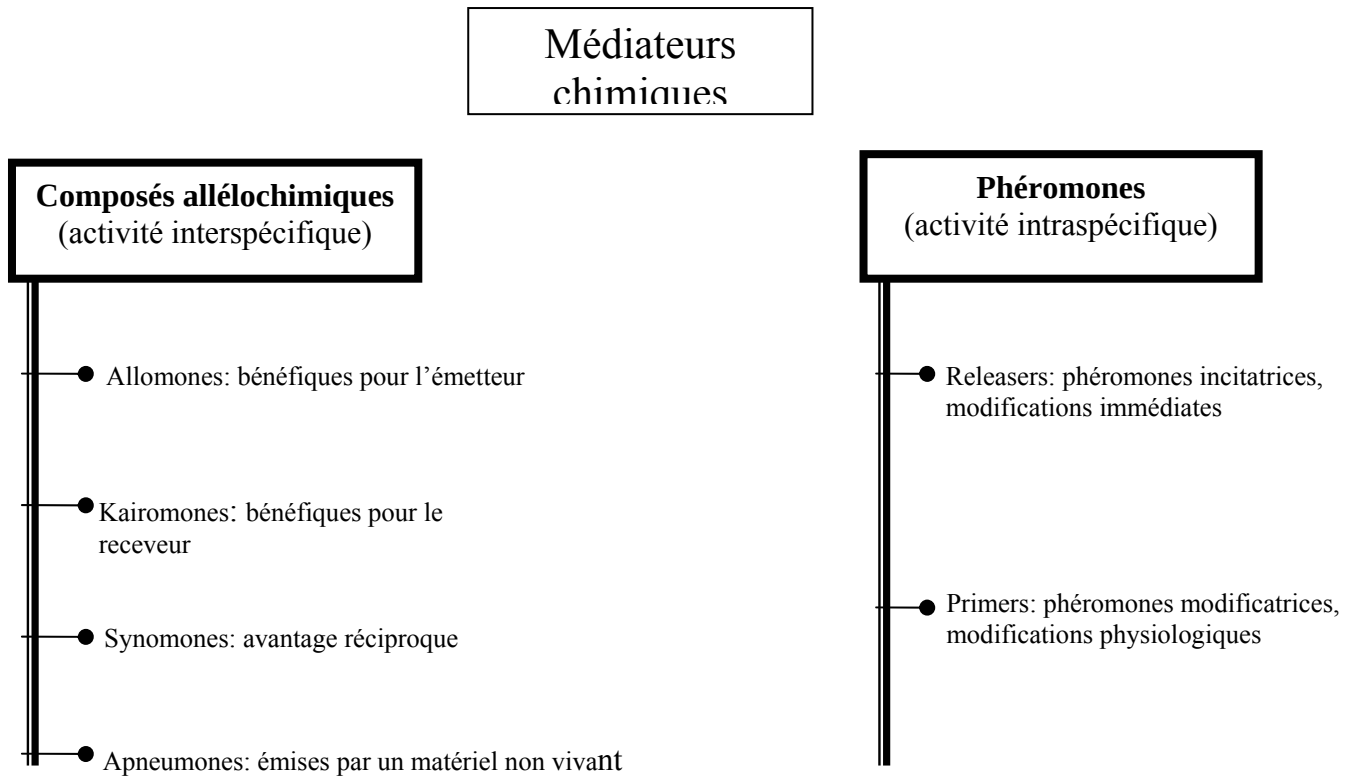


Figure 1. Les médiateurs chimiques impliqués dans l'olfaction. D'après Cassier *et al.*, 2000.

1.2. Primers Vs releasers

Les *primers* sont les signaux chimiques qui induisent d'importantes modifications physiologiques chez l'individu receveur (phéromones impliquées dans la grégarisation, le comportement parental, les relations subsociales et sociales ...). A l'opposé, on trouve les *releasers* qui induisent une modification immédiate du comportement: les phéromones d'alarme, de piste, de marquage territorial, de reconnaissance interindividuelle, sexuelle, d'agrégation et enfin, les phéromones d'espacement ou épidiectique (Cassier *et al.*, 2000). Voici quelques exemples de l'utilisation de ces phéromones *releasers*.

1.2.1. Phéromones d'alarme

Les abeilles (*Apis* sp.) sécrètent au niveau de leur appareil vulnérant (glandes de Koschevnikov, gaine de l'aiguillon) des composés qui sont libérés lors de l'exposition de la membrane poilue (fig. 2.) et qui provoquent un comportement d'alarme qui se traduit par le recrutement des gardiennes vers l'élément perturbateur, une réaction d'alarme et des piqûres (Cassier *et al.*, 2000; Wilson, 1974).

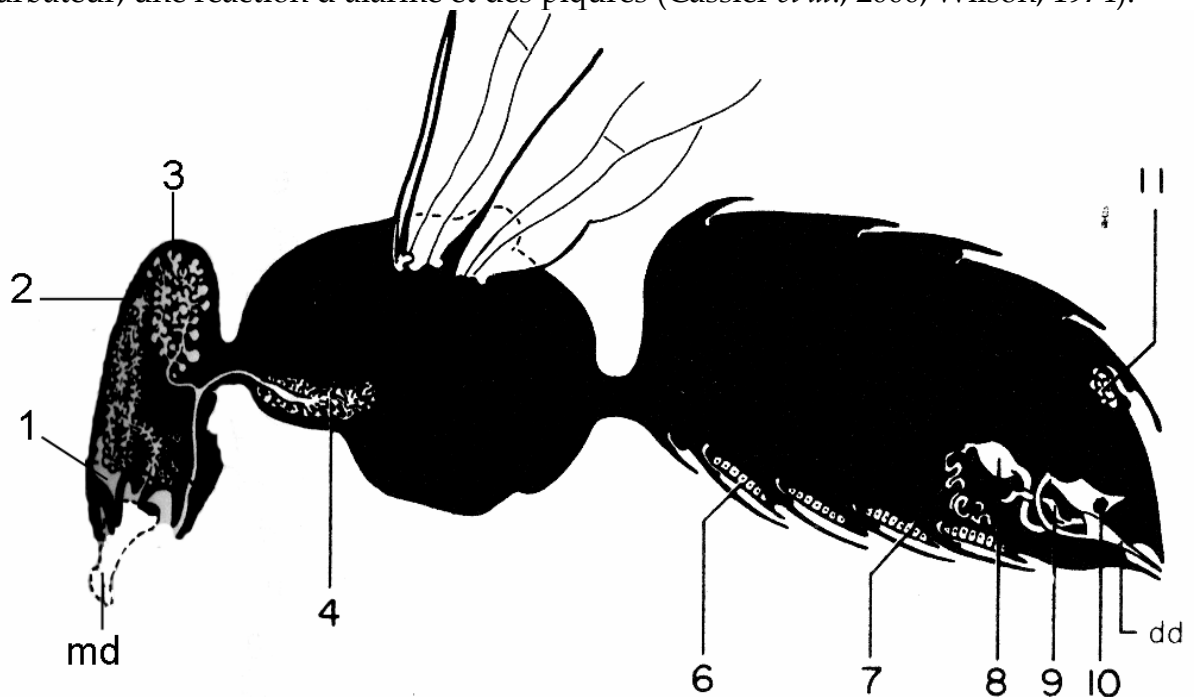


Figure 2. Illustration des multiples glandes exocrines de l'abeille domestique. 1 : glande mandibulaire ; 2 : glande hypopharyngée ; 3 : glande labiale céphalique ; 4 : glande labiale thoracique ; 6 : glande cirière ; 7 : glande vénéneuse ; 8 : réservoir de la glande vénéneuse ; 9 : glande de Dufour ; 10 : glande de Koschevnikov ; 11 : glande de Nasanov ; md : mandibules ; dd : base de l'aiguillon. D'après Wilson (1974).

Chez les fourmis, les ouvrières produisent, dans leur glande de Dufour, la substance d'alarme qui, accompagnée d'une décharge d'acide formique, provoque une réaction de panique et l'afflux d'ouvrières sur le lieu du combat (fig. 3.) (Cassier *et al.*, 2000).

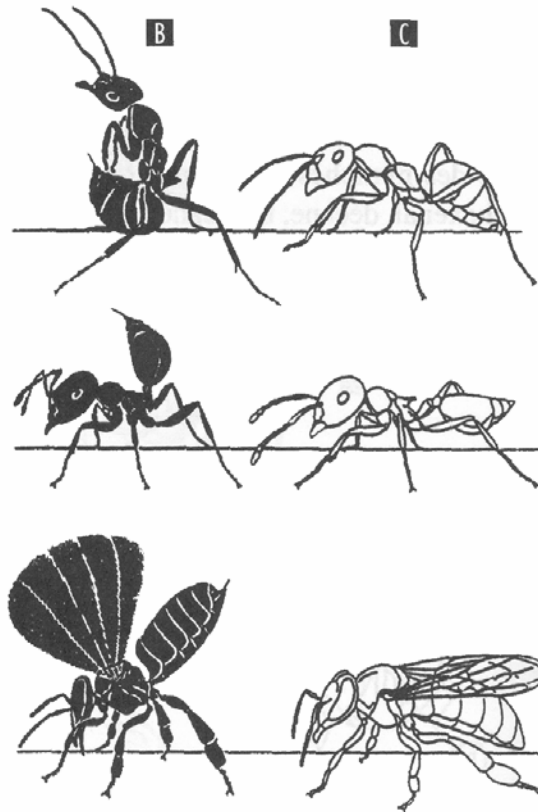


Figure 3. Postures d'alarme (B) et de repos (C) des fourmis *Formica polynecta* L., *Crematogaster ashmeadi* Emery et de l'abeille *Apis mellifera* L. D'après Cassier *et al.* (2000).

1.2.2. Phéromones de piste

Les termites produisent, dans leurs glandes sternales, une phéromone de piste qui est déposée sur le sol en solution lipidique lorsque l'insecte y applique son abdomen (fig. 4.) (Cassier *et al.*, 2000).

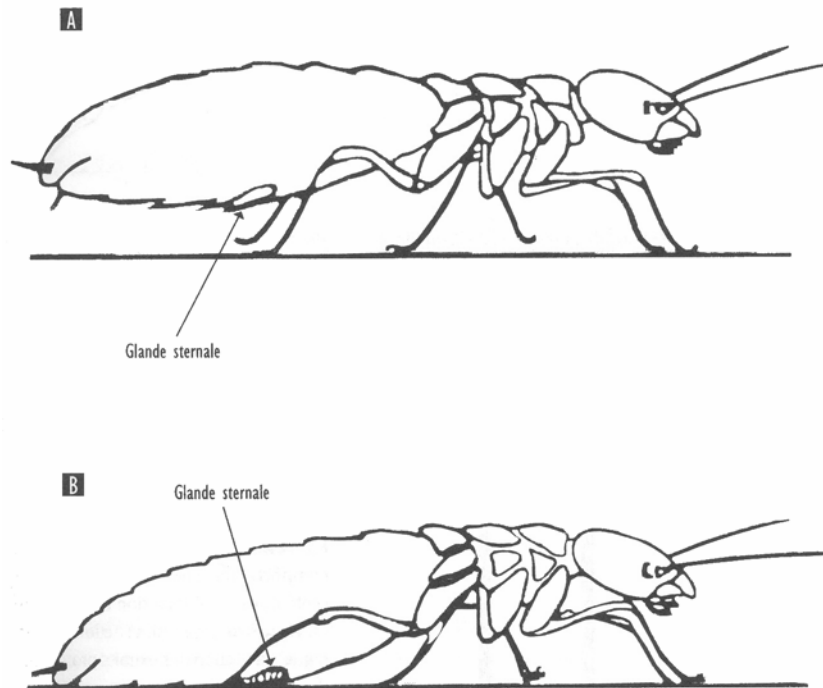


Figure 4. Les glandes sternales des nymphes du Terme *Zootermopsis nevadensis* et le dépôt d'une phéromone de piste. A : position de repos ; B : position de marquage. D'après Cassier *et al.* (2000).

1.2.3. Phéromones de marquage territorial

La marmotte alpine, *Marmota marmota* L. (Mammifère, rongeur) limite les intrusions de son territoire par le dépôt de sécrétions jugales complexes aux entrées des terriers principaux et aux limites de son territoire (Cassier *et al.*, 2000).

1.2.4. Phéromones de reconnaissance interindividuelles

Dans le monde animal, la reconnaissance de l'autre constitue la base de toute forme de socialité et repose le plus souvent sur la communication chimique (Cassier *et al.*, 2000). Les insectes sociaux ont la capacité de reconnaître les individus appartenant à différentes castes, les reines reçoivent ainsi un traitement privilégié. En plus de pouvoir reconnaître les différentes castes, les ouvrières d'abeilles sont en mesure de distinguer des différences entre les stades de vie.

Les nids des insectes présentent une odeur caractéristique qui associe l'identité chimique des individus, l'odeur des matériaux de construction, des aliments rapportés aux nids, des phéromones, etc. Cette odeur permet de reconnaître les intrus par rapport aux individus appartenant au nid (Cassier *et al.*, 2000).

Les phéromones de reconnaissance individuelle se retrouvent aussi chez les mammifères. Les cerfs possèdent sous leurs sabots des organes qui jouent un rôle important dans la reconnaissance des individus, notamment entre le faon et sa mère (Cassier *et al.*, 2000).

L'aptitude à distinguer les nouveaux-nés, les juvéniles et les adultes est une caractéristique universelle des vertébrés (Wilson, 1974).

1.2.5. Phéromones sexuelles

Les phéromones sexuelles sont des odeurs produites par les mâles ou les femelles qui stimulent une ou plusieurs réactions comportementales chez le sexe opposé. Au sein de l'ordre des Hyménoptères, l'utilisation de signaux chimiques semble être la méthode la plus communément employée dans le cadre de l'attraction sexuelle et de la reconnaissance individuelle (Ayasse *et al.*, 2001).

La première phéromone sexuelle qui a été identifiée chez un insecte est le bombycol du papillon femelle *Bombyx mori* L. (fig. 5.). Elle est perçue à très grande distance et est active à une concentration de 10^{-2} M (Cassier *et al.*, 2000).



Figure 5. Photo d'un *Bombyx mori* L.

1.2.6. Phéromones d'agrégation

Ces phéromones sont utilisées notamment par les amibes qui, en cas de carences nutritionnelles, cessent leur mode de vie unicellulaire pour former des agrégats de 1 à 2 mm (fig. 6.), constitués d'environ 10^5 cellules (Van Gansen & Alexandre, 1997).

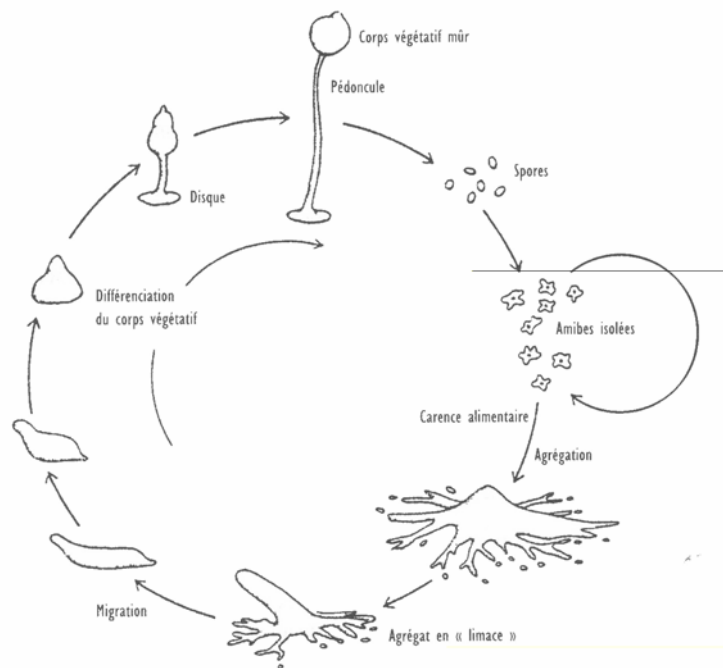


Figure 6. Cycle biologique des amibes *Dictyostelium discoideum*. D'après Alberts *et al.* (1999).

1.2.7. Phéromones d'espacement

Les plantes qui sont infestées par les Pucerons des céréales sont en général attractives pour cette espèce. Lorsque les populations sur une plante sont trop importantes, cette dernière émet des produits volatiles qui inhibent la colonisation par d'autres pucerons de la même espèce. Ces substances évitent la compétition intraspécifique et participent à la défense de la plante (Cassier *et al.*, 2000).

1.3. Modèle biologique

Le modèle biologique utilisé dans le cadre de ce travail est *Bombus terrestris* (L.), sa socialité et sa large distribution en font un modèle de choix pour l'étude du concept d'espèce. *Bombus terrestris* appartient au sous-genre *Bombus* Latreille, 1802 sensu stricto (= *Terrestribombus* Vogt, 1911) dans lequel on retrouve également les espèces suivantes : *Bombus cryptarum* (Fabricius), *Bombus lucorum* (L.), *Bombus sporadicus* Nylander et *Bombus magnus* Vogt en Europe occidentale ; *Bombus terricola* Kirby, *Bombus occidentalis* Greene et *Bombus moderatus* Cresson en Amérique du Nord ; *Bombus hypocrita* Perez et *Bombus ignitus* Smith au Japon ; *Bombus patagiatus* Nylander et *Bombus albosinatus* Vogt en Sibérie.

Bombus terrestris est la seule espèce de bourdons dont la distribution est centrée sur la Méditerranée (fig. 7.). Il s'étend jusqu'à la latitude de Stockholm au nord et jusqu'à l'Altaï à l'est. Il est néanmoins absent des milieux désertiques.

L'espèce étudiée comporte 9 sous-espèces (Rasmont *et al.*, 1983):

- ssp. *terrestris* (L.) qui se distribue dans toute l'Europe continentale au nord du 45^{ème} parallèle jusqu'au sud de la Fennoscandinavie ;
- ssp. *africanus* Krüger, 1956 en Afrique du Nord ;
- ssp. *audax* (Harris, 1780) des îles britanniques ;
- ssp. *dalmatinus* Dalla Torre, 1882 dont la distribution s'étend de l'extrême sud-est de la France et couvre tout le nord de la péninsule italique et les Balkans ;
- ssp. *lusitanicus* Krüger, 1956 que l'on retrouve dans le sud-ouest de la France, en péninsule ibérique, aux Baléares et à Madère ;
- ssp. *calabricus* Krüger, 1958 dans le sud de l'Italie, la Calabre et la Sicile ;
- ssp. *sassaricus* Tournier, 1890 endémique de Sardaigne ;
- ssp. *xanthopus* Kriechbaumer, 1870 en Corse, sur l'île de Capraia et sur l'île d'Elbe ;
- ssp. *canariensis* Pérez, 1895 qui est le seul bourdon de l'archipel des Canaries.

Il est important de noter que les ssp. *terrestris* et *lusitanicus* se mélangent graduellement et définissent ainsi un gradient qui s'étend du Sud de la France jusqu'au centre de l'Allemagne. L'hybride de ces deux sous-espèces constitue la forme *ferrugineus* Schmiedeknecht (Rasmont *et al.*, in prep.).

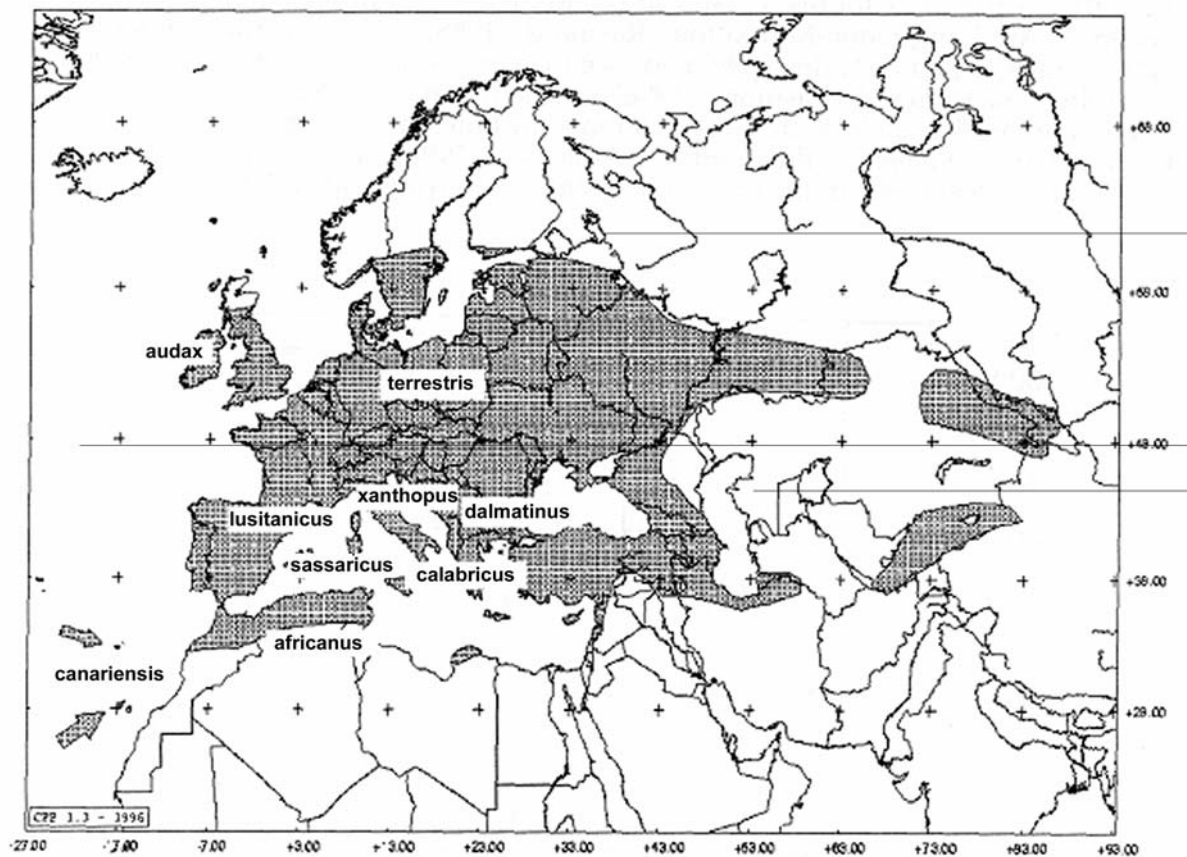


Figure 7. Distribution de *B. terrestris*. D'après Rasmont *et al.* (in prep).

Les différentes sous-espèces sont bien marquées, à tel point que certaines d'entre elles (*xanthopus*, *canariensis* et *sassaricus*) ont été considérées comme de bonnes espèces. En effet, ces sous-espèces se distinguent par leur coloration remarquable, mais aussi par certaines particularités éthologiques, par exemple une période de diapause différente (Rasmont *et al.*, in prep.).

Estoup *et al.* (1996) ont effectué une étude génétique de la différenciation entre les sous-espèces continentales et insulaires de *B. terrestris* en Europe, par l'utilisation de microsatellites. Cette étude montre qu'il existe une homogénéité génétique au sein des populations continentales. Le flux d'échange génétique étant constant, ils observent une cline génétique entre les différentes populations, mais pas de différence marquée. Au contraire, les sous-espèces insulaires, plus hétérogènes, montrent des différences fortes et significatives.

1.4. La notion d'espèce

Il semble important de préciser ici les notions d'espèce et de sous-espèce. Malgré qu'elles soient couramment utilisées, elles ne sont pas toujours définies de manière précise. De nombreux auteurs présentent différentes définitions de ces deux termes qui convergent plus ou moins.

Pour les bourdons, la définition la mieux adaptée au terme d'espèce semble être celle de Paterson (1993), qui la définit comme l'ensemble des individus qui partagent le même SMRS (Species Mate Recognition System) ou système de reconnaissance spécifique. Au travers de ces termes, Paterson donne une vision radicalement différente de la notion d'espèce, en comparaison à la définition classique de Mayr (1963). En effet, le niveau auquel on se place si l'on considère que les individus qui forment une espèce sont ceux capables de se reconnaître entre eux (par le SMRS) est foncièrement différent de celui qu'on considère lorsqu'on définit l'espèce comme l'ensemble des individus capable de produire une descendance. D'après Paterson, les signaux sexuels (visuels, chimiques...) servent à maximiser la reconnaissance entre les individus, alors que selon la théorie de Mayr, leur utilité est d'éviter l'hybridation.

Les sous-espèces sont quant à elles définies comme des populations génétiquement distinctes, séparées géographiquement mais qui appartiennent à la même espèce et donc s'hybrident librement aux zones de contact (Wilson & Brown, 1953).

1.5. Le SMRS des bourdons

Chez les bourdons, ce sont les mâles qui produisent les phéromones sexuelles et attirent les femelles dans le but de se reproduire.

On leur connaît 3 ou 4 formes de parades nuptiales, selon les auteurs:

❖ Classification en 4 formes, d'après Schremmer, 1972:

- Vol à l'entrée du nid en attente des femelles;
- Vol de patrouille régulier, en milieu ouvert, qui permet au mâle de s'approcher du nid facilement;
- Vol de patrouille régulier loin du nid;
- Attente sur un perchoir, avec inspection des insectes volants aux alentours.

❖ Classification en trois formes, d'après Bergman (1997):

- "Nest waiting behaviour": comportement d'attente des femelles à leur sortie du nid;
- "Perching behaviour": comportement du mâle qui se choisit un perchoir autour duquel il inspecte tout insecte volant;
- "Patrolling behaviour": comportement du mâle qui établit un circuit, grâce à des marques odorantes, qu'il patrouille ensuite.

Dans cette deuxième classification, les deux types de vols de patrouille sont regroupés sous le terme de "patrolling behaviour" et ne sont plus distingués l'un de l'autre selon qu'il passe ou non par le nid.

La forme de parade nuptiale qui est le sujet de ce travail est le marquage d'un circuit et sa patrouille ("patrolling behaviour"). Le mâle dépose ses sécrétions en mordillant le bord des feuilles, la base des troncs ou des brindilles le long d'un circuit durant la matinée (fig. 8.).

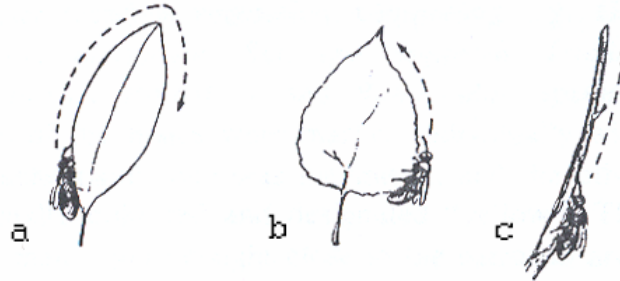


Figure 8. Comportement de marquage d'un mâle de *Bombus lapponicus* (Fabricius): (a) sur une feuille de *Salix glauca* L., (b) sur une feuille de *Betula tortuosa* L., et (c) sur une branche sèche de *Betula nana* L.. D'après Svensson (1979).

Le reste de la journée est consacré à la patrouille du circuit (fig. 9.) constitué afin d'y rencontrer une femelle vierge attirée par les sécrétions (Svensson, 1979). Le cas échéant et, si la femelle est réceptive au contact du mâle, la copulation pourra avoir lieu.

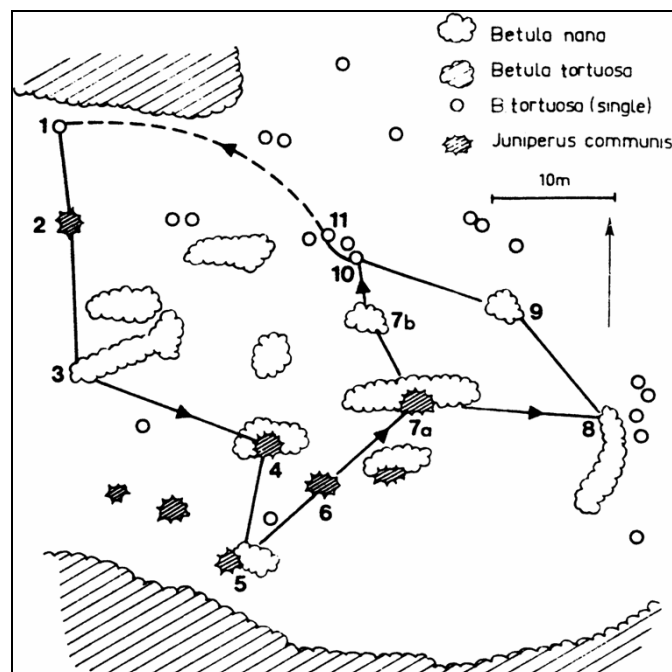


Figure 9. Circuit de patrouille (flèches) et de marquage (numéro 1-11) d'un mâle de *Bombus flavidus* Eversmann. D'après Cederberg *et al.* (1984).

Chez *B. terrestris*, les mâles peuvent se regrouper pour constituer le circuit de marquage (Svensson, 1979). La concentration en phéromones étant plus élevée, cela augmente les chances d'attirer les femelles. Néanmoins, chaque mâle crée une partie de circuit personnelle, qui se détache du circuit commun sur quelques dizaines de mètres pour le rejoindre plus loin. Des associations de plusieurs dizaines de mâles ont été observées.

1.6. Les sécrétions des glandes labiales céphaliques

Les phéromones de marquage sont synthétisées dans 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 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. 10.).

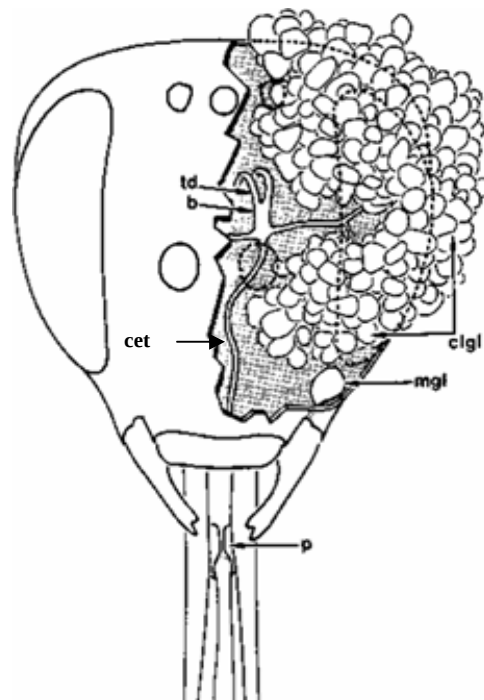
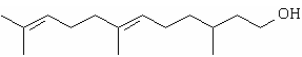
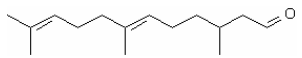
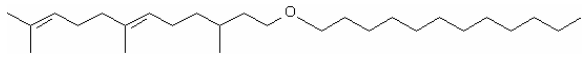
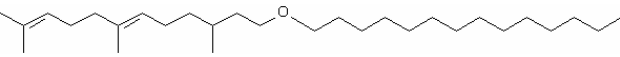
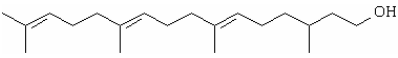
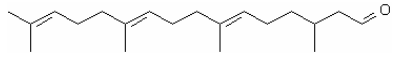
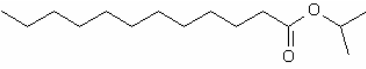
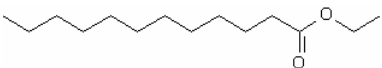


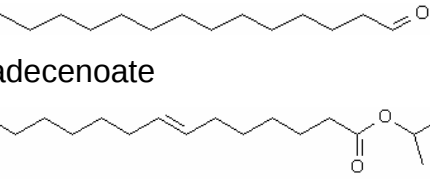
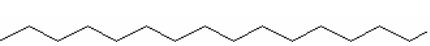
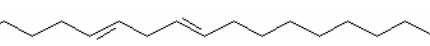
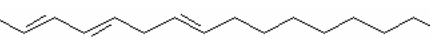
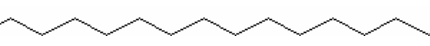
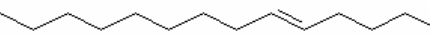
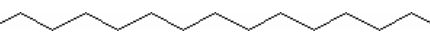
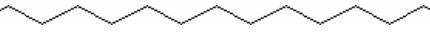
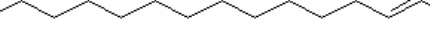
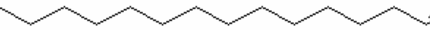
Figure 10. Dessin semidiagrammatique de la tête de *Bombus lapidarius* (L.) mâle, en vue frontale. **b** : bourse ; **cet** : canal excréteur terminal ; **clgl** : glande céphalique labiale ; **mgl** : glande mandibulaire ; **p** : paraglosse ; **td** : conduits de la glande labiale thoracique. D'après Ågren *et al.* (1979).

Les principaux composés des sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. terrestris* sont connus depuis longtemps. Calam (1969) a déterminé que cette composition était spécifique, grâce notamment à la présence d'un composé majeur, le DHTF (2,3-dihydro-6-trans-farnesol), chez *B. terrestris*. Les composés sont classés selon leur abondance relative en composés dits "majeurs", "moyens" et "mineurs". Ainsi, deux espèces qui partagent la même molécule majeure peuvent être distinguées grâce à des molécules moyennes et mineures différentes.

Les sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. terrestris* ont été étudiées à plusieurs reprises depuis les années '70 (Calam, 1969; Kullenberg, 1973; Svensson, 1979; Bergström *et al.*, 1981). En 1997, Bergman décrit 23 molécules sécrétées dans les glandes labiales céphaliques de *B. 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

Du point de vue intraspécifique, il a été démontré que l'âge des mâles a une influence non négligeable sur la composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques (Ågren *et al.*, 1979; Coppée, 2005). Par contre, la composition de la nourriture n'engendre pas de variation de celle des sécrétions. En effet, les molécules retrouvées dans les sécrétions des glandes labiales céphaliques sont synthétisées *de novo* (Bergman, 1997).

1.8. La chémotaxonomie

L'utilisation de la composition de sécrétions des glandes labiales céphaliques a déjà été utilisée pour résoudre des indécisions concernant le statut taxonomique d'espèces ou de sous-espèces, là où les caractéristiques morphologiques ne suffisent pas.

Ainsi, Rasmont *et al.* (2005) ont réexaminé le statut de 3 espèces du sous-genre *Sibiricobombus* Vogt. Il ressort de cette étude que deux des espèces étudiées (*Bombus niveatus* Kriechbaumer et *Bombus vorticatus* Gerstaecker) sont en réalité conspécifiques.

Les statuts taxonomiques d'autres taxons ont été confirmés par l'analyse des phéromones. *Bombus ruderarius ruderarius* et *Bombus ruderarius montanus* sont deux sous-espèces sympatriques. Le statut spécifique ou subsppécifique de *B. rud. montanus* n'était pas clairement déterminé jusqu'à ce que les sécrétions de ses glandes labiales céphaliques soient comparées avec celles de *B. rud. ruderarius* et de *Bombus sylvarum*, une espèce proche. La variabilité intraspécifique est plus faible que la variabilité interspécifique, ce qui a permis de confirmer le statut subsppécifique de *B. rud. montanus* (Terzo *et al.*, 2005).

1.9. Objectifs

Les objectifs de ce travail sont les suivants:

- déterminer les variations quantitatives et qualitatives des sécrétions des glandes labiales céphaliques chez 4 sous-espèces de *B. terrestris* (*Bombus terrestris terrestris*, *Bombus terrestris lusitanicus*, *Bombus terrestris sassaricus* et *Bombus terrestris dalmatinus*);
- valider ou invalider le statut taxonomique actuel des taxons étudiés;
- confirmer, par l'analyse chimique, l'existence d'une hybridation possible entre les deux sous-espèces qui se rencontrent aux Pyrénées.

2. Matériel et méthode

2.1. Matériel biologique

Quatre sous-espèces de *Bombus terrestris* sont étudiées : *Bombus terrestris terrestris*, *Bombus terrestris lusitanicus*, *Bombus terrestris sassaricus* et *Bombus terrestris dalmatinus*. Les specimens de *Bombus terrestris terrestris* et *Bombus terrestris lusitanicus* étudiés ont été récoltés dans les Pyrénées. Ils peuvent être considérés comme appartenant tous à la même population (*Bombus terrestris lusitanicus* forme *ferrugineus*), qui résulte du phénomène d'hybridation qui intervient entre ces deux sous-espèces dans la région (le Languedoc en général). On peut distinguer deux formes chez ces hybrides, leurs robes sont identiques, mais chez l'une d'elles les soies des corbeilles sont noires, comme chez *Bombus terrestris terrestris* et chez l'autre elles sont rousses, comme chez *Bombus terrestris lusitanicus*.

Les deux formes sont considérées individuellement dans la présente étude. Pour une question de simplification terminologique, les specimens aux soies noires seront appelés *B. ter. terrestris* et les spécimens aux soies rousses seront appelée *B. ter. lusitanicus*.

2.1.1. *Bombus terrestris terrestris*

Trente spécimens de *B. ter. terrestris* ont été récoltés dans les Pyrénées-Orientales.

Nombre de spécimens	Coordonnées et dénomination	Descriptif de la station	Plantes
2	F., Pyrénées-Orientales, Corbère. WGS84: 42°39'34"N, 2°40'07"E. 11.VII.2004 164m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
5	F., Pyrénées-Orientales, Millas. WGS84: 42°42'27"N, 2°42'41"E. 17.VII.2004 102m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
11	F., Pyrénées-Orientales, Millas. WGS84: 42°42'44"N, 2°42'36"E. 17.VII.2004 81m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
10	F., Pyrénées-Orientales, Ille-sur-Têt. WGS84: 42°40'40"N, 2°38'01"E. 17.VII.2004 136m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
1	F., Pyrénées-Orientales, Corbère. WGS84: 42°39'35"N, 2°40'10"E. 17.VII.2004 150m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
1	F., Pyrénées-Orientales, Corbère-les-Cabanes. WGS84: 42°39'39"N, 2°40'40"E. 17.VII.2004 146m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>

2.1.2. *Bombus terrestris lusitanicus*

Vingt-sept spécimens de *B. ter. lusitanicus* ont été récoltés dans les Pyrénées-Orientales.

Nombre de spécimens	Coordonnées et dénomination	Descriptif de la station	Plantes
1	F., Pyrénées-Orientales, Camélas. WGS84: 42°39'50"N, 2°42'38"E. 07.VII.2004 111m	Au milieu d'un verger (pêches), fossé avec <i>Typha latifolia</i> , <i>Lythrum salicaria</i> et <i>Scabiosa atropurpurea</i>	<i>Scabiosa atropurpurea</i> L.
3	F., Pyrénées-Orientales, Corbère. WGS84: 42°39'34"N, 2°40'07"E. 11.VII.2004 164m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
1	F., Pyrénées-Orientales, Corbère-les-Cabanes. WGS84: 42°39'33"N, 2°41'00"E. 11.VII.2004 146m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
1	F., Pyrénées-Orientales, Banyuls dels Aspres. WGS84: 42°33'51"N, 2°52'21"E. 11.VII.2004 111m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
2	F., Pyrénées-Orientales, Millas. WGS84: 42°42'27"N, 2°42'41"E. 17.VII.2004 102m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
6	F., Pyrénées-Orientales, Millas. WGS84: 42°42'44"N, 2°42'36"E. 17.VII.2004 81m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>
13	F., Pyrénées-Orientales, Ille-sur-Têt. WGS84: 42°40'40"N, 2°38'01"E. 17.VII.2004 136m	Jardin en bord de route	<i>Lavandula x intermedia</i>

2.1.3. *Bombus terrestris sassaricus*

Deux reines fécondées ont été capturées dans le Nord de la Sardaigne et mises en élevage au sortir de diapause par Nigel Raine (University of London, London). Vingt mâles âgés de 4 à 27 jours, âge auquel les mâles sont aptes à se reproduire (Coppée, 2005), ont été étudiés. Dix mâles ont été prélevés de chacune des colonies.

2.1.4. *Bombus terrestris dalmatinus*

25 mâles âgés de 4 à 25 jours, ont été tirés au sort (logiciel R.2.1.1.) parmi les mâles produit par une colonie (fig. 12.) unique fournie par la société Biobest *bvba*, Westerlo, Belgique.

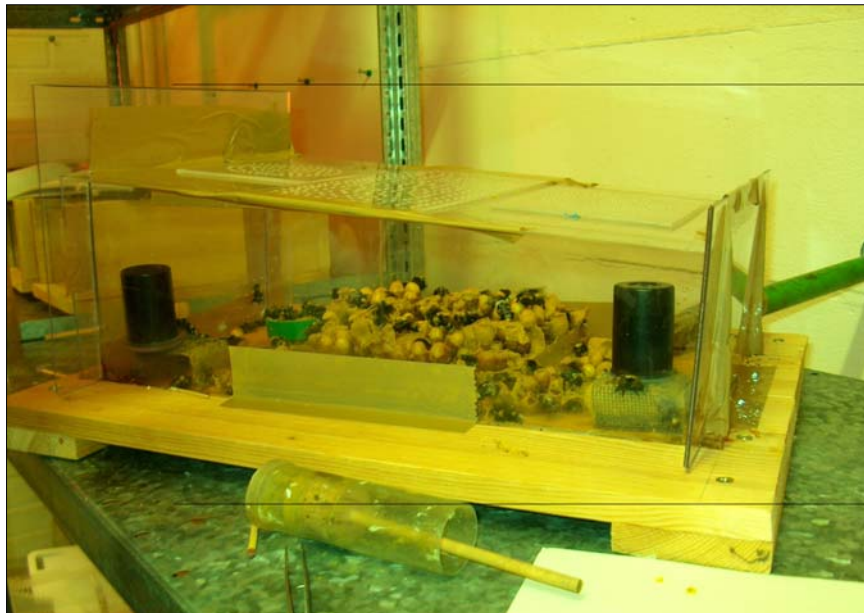


Figure 12. Colonie de *B. terrestris dalmatinus*.

Les mâles ont été tués aux âges fixes de 4, 5, 7, 10, 15, 20 et 25 jours. Afin de reproduire la répartition des âges telle qu'on l'aurait en conditions naturelles, une courbe de survie (fig. 13.) est utilisée pour calculer le nombre de mâles de chaque classe d'âge à étudier.

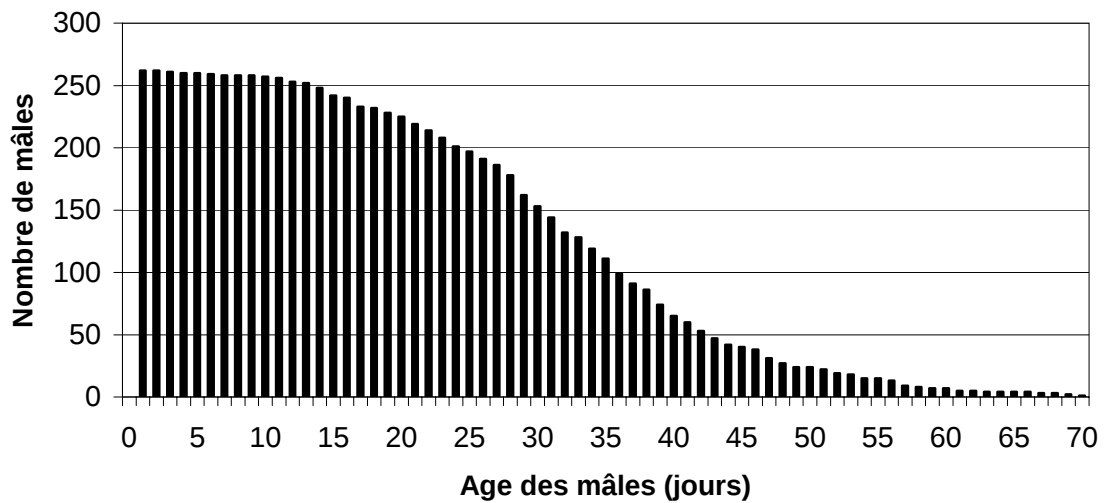


Figure 13. Courbe de survie des mâles de *B. terrestris*. Recalculée d'après les données de Regali (1996)..

Le calcul consiste à sommer le nombre de mâles survivant dans toutes les classes d'âge étudiées, et à diviser le nombre de mâles d'une classe par cette somme. On obtient de cette façon la proportion de mâles survivants par classe d'âge.

Le nombre de mâles utilisé par classe d'âge est:

4 mâles de 4 jours, 4 mâles de 5 jours, 4 mâles de 7 jours, 4 mâles de 10 jours, 3 mâles de 15 jours, 3 mâles de 20 jours et 3 mâles de 25 jours.

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 important volume les rend facilement identifiables. Elles sont prélevées avec une pince fine et placées dans un flacon avec 200µl d'hexane (Terzo *et al.*, 2005) (fig. 14.).

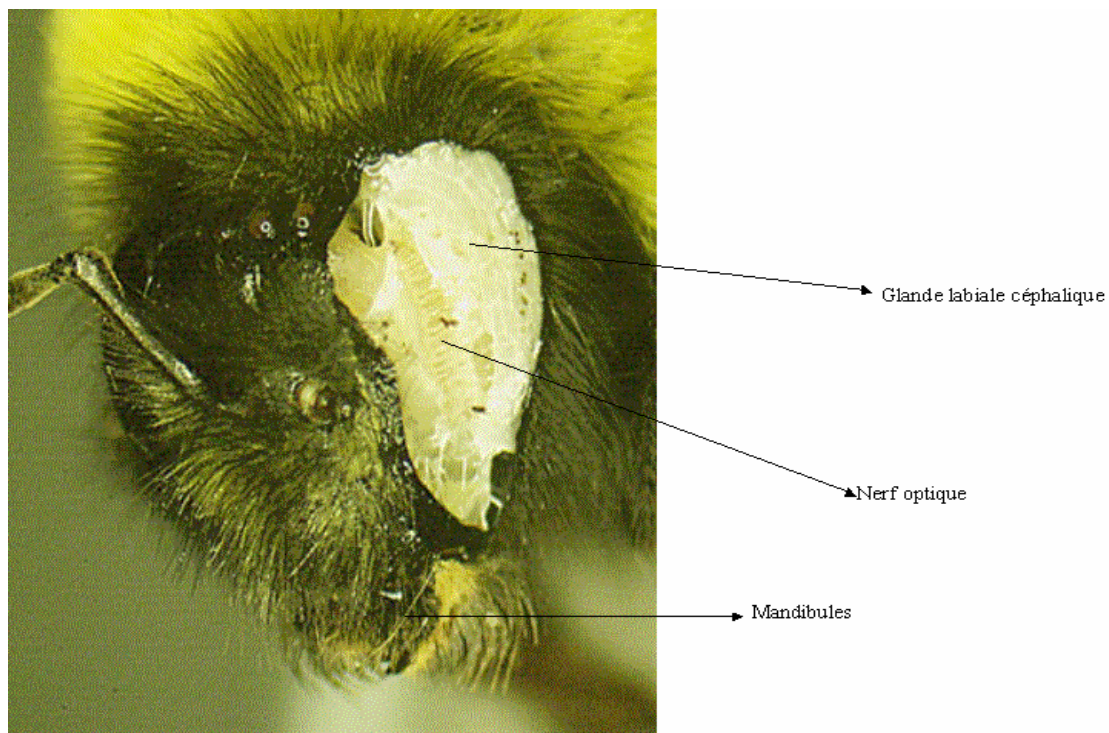


Figure 14. Dissection des glandes labiales céphaliques. L'œil gauche a été enlevé laissant voir la glande labiale céphalique.

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 flacons sont placés 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

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. 15.).



Figure 15. GC-MS utilisé pour les analyses.

2.4. Analyse statistique

2.4.1. Constitution de la matrice

Le logiciel Xcalibur calcule par intégration 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. 16.).

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 brutes.

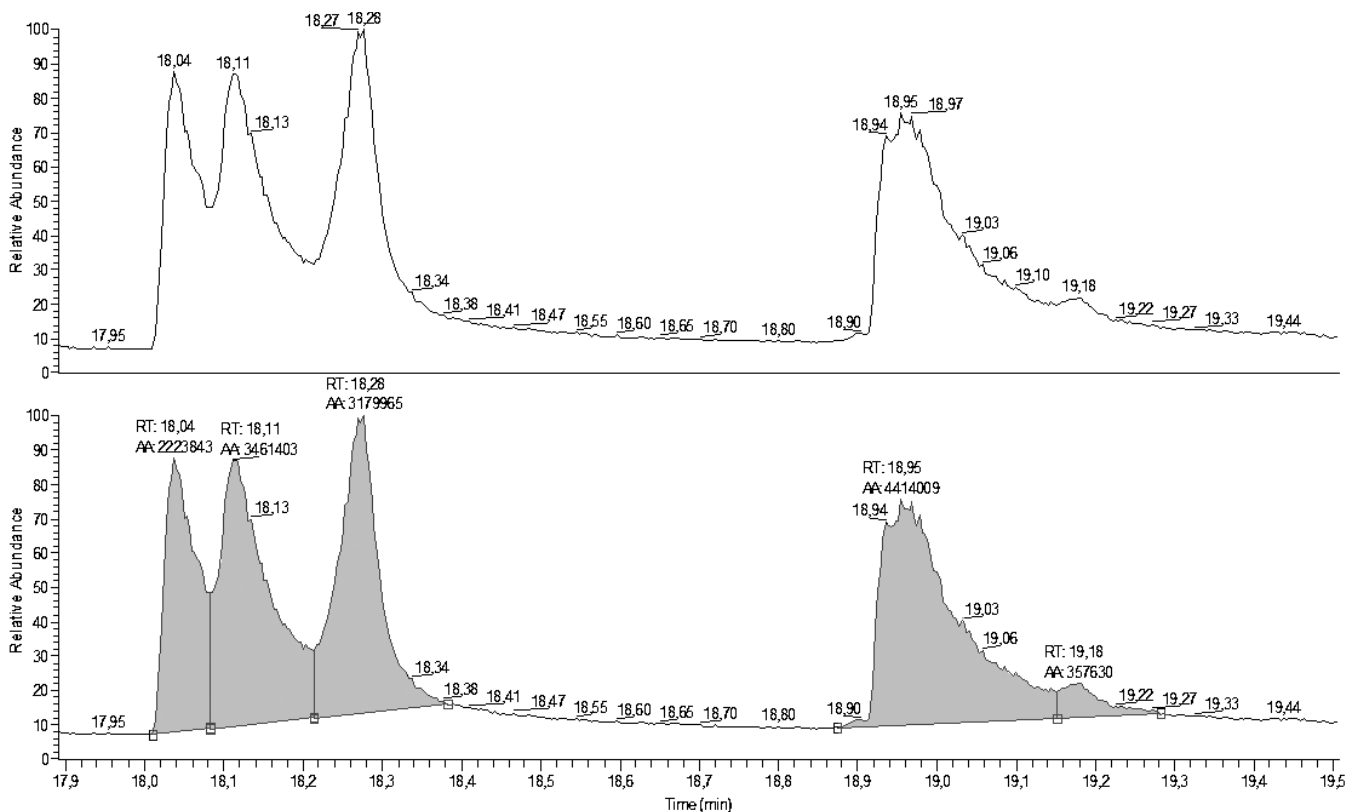


Figure 16. Chromatogramme d'un *B. terrestris dalmatinus* avant le calcul de l'intégrale (haut), le même chromatogramme après le calcul de l'intégrale (bas).

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 qui est la carte d'identité de la molécule.

Trois spécimens de *Bombus terrestris terrestris* sont éliminés de l'étude, car l'analyse de leurs sécrétions a échoué. Finalement, la matrice obtenue est constituée de 99 lignes (individus) et de 102 colonnes (composés). Les valeurs qu'elle contient sont les aires de chaque pic (fig. 17.).

Molécules/ Spécimens	Sp1	Sp2	Sp3	...
Mol1	Aire 1.1.	Aire1.2.	Aire 1.3.	
Mol2	Aire 2.1.	Aire 2.2.	Aire 2.3.	
Mol3	Aire 3.1.	Aire 3.2.	Aire 3.3.	
...				

Figure 17. Exemple de remplissage de la matrice de données brutes.

2.4.2. Analyse en composantes principales (ACP)

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.

Le logiciel R (R development Core Team, 2004) est utilisé pour effectuer cette analyse. Le script qui permet d'effectuer l'ACP dans R est joint en annexe (Annexe 1).

La matrice utilisée pour effectuer cette analyse est tirée de la matrice de données brutes (99 individus $\times$ 102 composés, exprimant la surface des pics).

Avant l'ACP, la méthode des vecteurs équivalents 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 variance et d'éliminer les variables qui leur sont fortement corrélées et qui peuvent ainsi être ôtées de l'analyse. En effet, l'ACP ne s'effectue au moyen de R que si le nombre de variables est inférieur aux deux tiers du nombre d'individus.

On obtient un classement des variables dans l'ordre décroissant de la variance totale expliquée.

2.4.3. Analyse discriminante linéaire (ADL)

L'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 par rotation des axes, en cherchant à maximiser la matrice variance-covariance intergroupe. L'ADL permet ensuite de classer des objets en plusieurs groupes déterminés au préalable (Tomassone, 1988).

Le logiciel R est utilisé pour effectuer cette analyse. Le script qui permet d'effectuer l'ADL dans R est joint en annexe (Annexe 2).

2.4.4. Classification hiérarchique

Deux logiciels sont utilisés pour effectuer les classifications hiérarchiques: R et NTSys.

2.4.4.1. Rprat dans R

A partir de la matrice de données brute, le logiciel constitue un arbre décisionnel de façon dichotomique. Il recherche les variables qui permettent de diviser la population en deux, puis pour chaque groupe recommence la même opération, jusqu'à ce que ce ne soit plus possible.

2.4.4.2. NTSys

La matrice de données brutes de rang 99 individus x 102 composés qui exprime la surface des pics est transformée ($\log +1$) puis standardisée ($-m/\sigma$).

On calcule une matrice d'association à partir de la matrice transformée et standardisée. L'association utilisée ici est la corrélation de Pearson. La matrice de corrélation est ensuite utilisée afin de construire un dendrogramme par la méthode UPGMA.

Le calcul de la corrélation et la réalisation du dendrogramme sont effectués grâce au logiciel NTSys (Rholf, 1993).

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

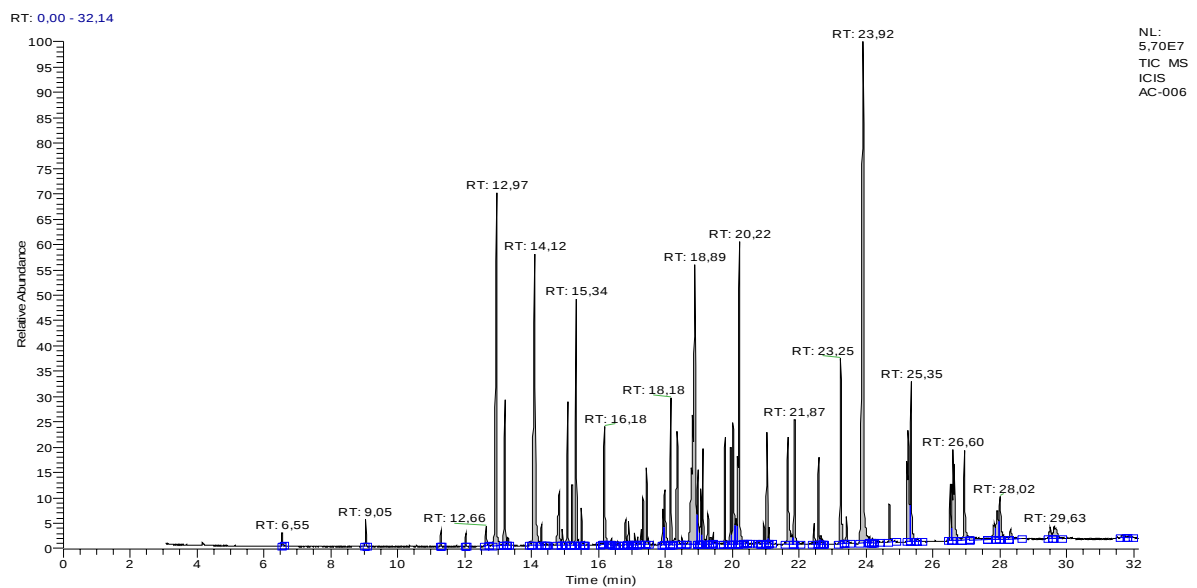
3. Résultats

3.1. Analyse par GC-MS

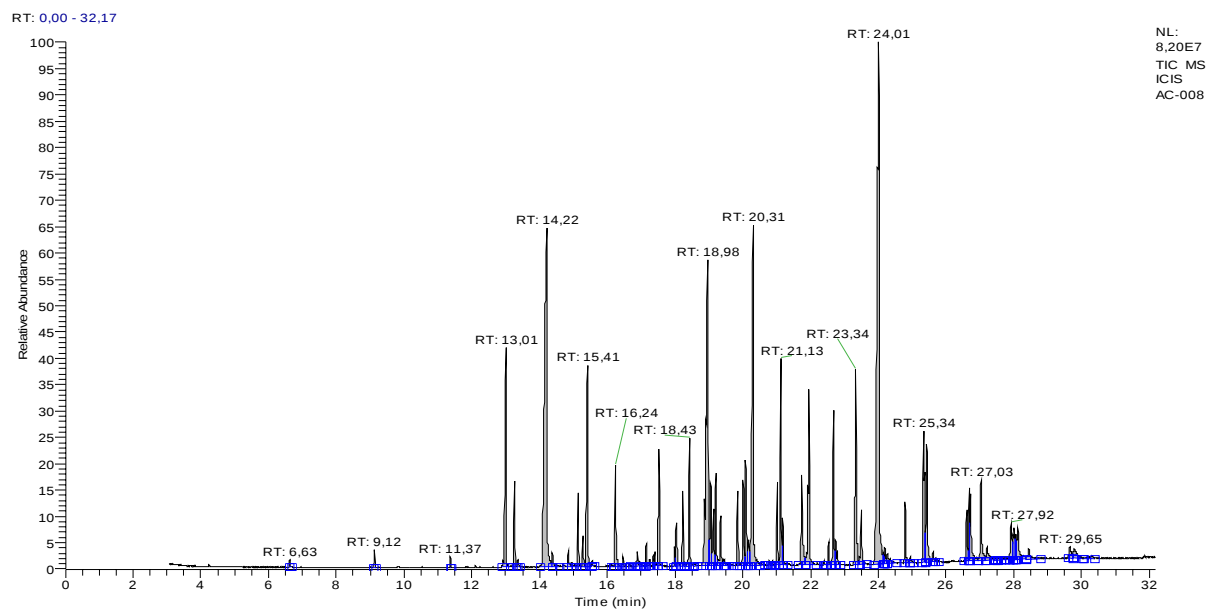
Les chromatogrammes obtenus par injection au GC-MS montrent, en première observation, des variations liées à la sous-espèce à laquelle le spécimen appartient.

Le DHTF (= 2,3dihydro-6-transfarnesol, la molécule majeure) n'est pas présent dans les mêmes proportions en fonction de la sous-espèce étudiée (tab. 2.).

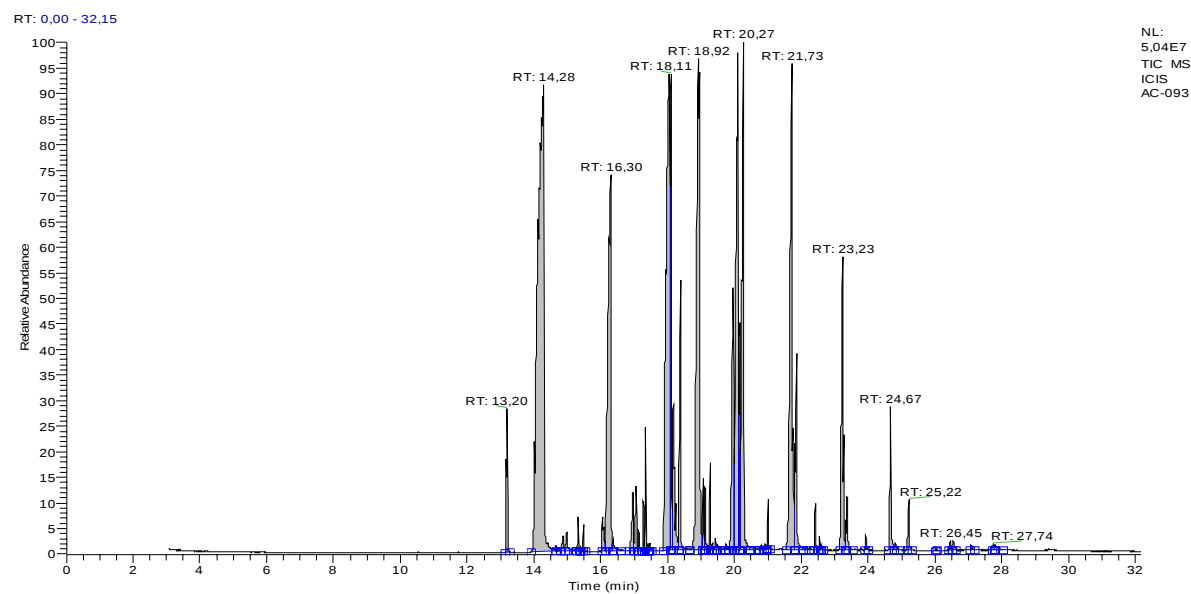
- *ssp. terrestris*



- *ssp. lusitanicus*



- *ssp. sassaricus*



- *ssp. dalmatinus*

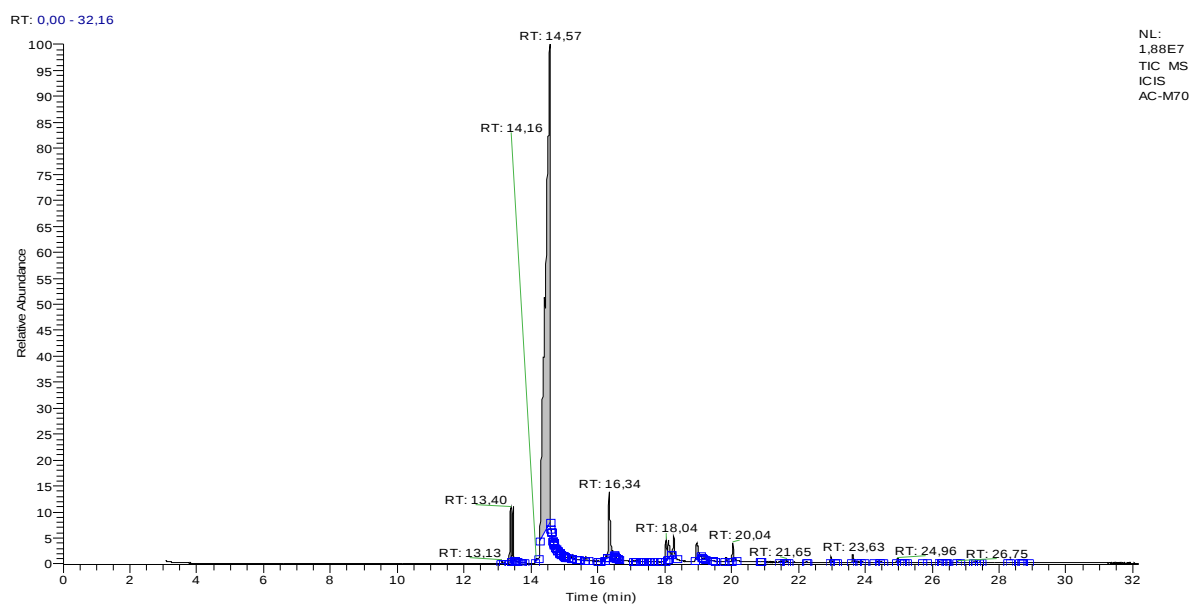


Tableau 2. Moyenne de l'aire du pic de DHTF en fonction de la sous-espèce étudiée

Molécule	Temps de rétention (min)	<i>terrestris</i> (aire en %)	<i>lusitanicus</i> (aire en %)	<i>sassaricus</i> (aire en %)	<i>dalmatinus</i> (aire en %)
X013-DHTF	14,08	9,67	9,96	19,15	48,27

Outre les variations observées pour la molécule majeure, d'autres composés, moyens ou mineurs, varient fortement ou disparaissent chez les différentes sous-espèces (tab. 3.). Ainsi, 26 molécules sont communes aux 4 taxons étudiés (en rouge), 24 molécules sont communes à 3 des taxons étudiés (en orange), 28 molécules sont communes à 2 des taxons étudiés (en bleu) et 24 molécules sont spécifiques à un seul taxon (en bleu ciel).

Tableau 3. Aire moyenne des 102 composés en fonction des 4 sous-espèces.

Molécules	RT	<i>terrestris</i>	<i>lusitanicus</i>	<i>sassaricus</i>	<i>dalmatinus</i>
X001	11,34	0,14	0,12	0,00	0,00
X002	11,61	0,00	0,02	0,00	0,00
X003	12,09	0,17	0,15	0,00	0,00
X004	12,60	1,55	1,35	0,00	0,00
X005	12,95	5,87	6,50	0,00	0,00
X006	13,06	0,00	0,00	0,00	0,01
X007	13,19	0,00	0,00	0,00	0,01
X008	13,23	2,89	2,30	1,35	0,03
X009	13,35	0,12	0,16	0,00	1,26
X010	13,56	0,00	0,00	0,00	1,10
X011	13,65	0,00	0,00	0,00	1,73
X012	14,01	0,03	0,02	0,00	0,14
X013-DHTF	14,08	9,67	9,96	19,15	48,27
X014	14,30	0,15	0,12	0,06	0,00
X015	14,31	0,00	0,01	0,00	0,00
X016	14,51	0,00	0,03	0,07	0,00
X017	14,84	0,70	0,58	0,26	0,00
X018	14,92	0,63	0,62	0,22	0,00
X019	15,09	0,52	0,54	0,00	0,00
X020	15,22	0,57	0,60	0,01	0,09
X021	15,34	3,03	2,79	0,11	0,35
X022	15,35	0,00	0,00	0,02	0,00
X023	15,53	0,40	0,34	0,36	0,00
X024	15,58	0,01	0,00	0,00	0,00
X025	15,74	0,00	0,00	0,00	0,26
X026	15,83	0,00	0,00	0,00	0,14
X027	16,09	0,03	0,01	0,27	0,00
X028	16,15	0,00	0,00	0,00	0,01
X029	16,18	1,14	0,93	8,65	0,11
X030	16,43	0,05	0,04	0,10	0,00
X031	16,53	0,03	0,02	0,00	3,17
X032	16,62	0,03	0,01	0,00	0,00
X033	16,82	0,38	0,41	0,00	0,00
X034	16,91	0,48	0,36	0,75	0,00
X035	16,97	0,24	0,00	0,00	0,00
X036	17,02	0,33	0,37	0,25	0,00
X037	17,13	0,09	0,13	0,14	0,00
X038	17,14	0,00	0,03	0,00	0,00
X039	17,20	0,00	0,12	0,38	0,04
X040	17,34	0,49	0,28	0,66	0,10
X041	17,44	1,11	1,22	0,03	0,00
X042	17,55	0,00	0,00	0,03	0,04
X043	17,61	0,00	0,00	0,00	0,09
X044	17,82	0,00	0,01	0,00	0,21
X045	17,93	0,26	0,26	0,00	0,00
X046	18,04	0,93	0,48	10,21	0,00
X047	18,05	0,00	0,00	4,62	0,00
X048	18,11	0,00	0,00	1,33	0,00
X049	18,20	2,35	1,81	0,27	0,01
X050	18,27	0,00	0,01	0,09	3,12
X051	18,39	1,70	1,32	2,31	2,75
X052	18,53	0,06	0,06	0,00	0,00
X053	18,80	10,85	0,57	0,00	0,00
X054	18,90	1,64	9,67	9,67	2,41
X055	19,01	1,19	1,12	0,00	0,00

X056	19,07	0,00	0,84	0,41	0,00
X057	19,16	1,10	1,17	0,28	0,00
X058	19,31	0,53	0,49	0,41	8,39
X059	19,35	0,15	0,00	0,05	0,00
X060	19,44	0,19	0,00	0,11	0,00
X061	19,63	0,00	0,00	0,07	0,64
X062	19,79	0,83	0,76	0,02	0,01
X063	19,99	1,14	0,89	2,81	0,00
X064	20,08	1,31	1,22	10,32	1,40
X065	20,12	0,31	0,35	0,89	0,00
X066	20,21	6,38	5,44	6,13	10,18
X067	20,37	0,02	0,00	0,00	0,05
X068	20,50	0,01	0,04	0,06	0,00
X069	20,55	0,00	0,00	0,03	0,00
X070	20,72	0,00	0,00	0,05	0,00
X071	20,81	0,04	0,07	0,06	0,00
X072	20,88	0,00	0,00	0,00	0,14
X073	20,95	0,39	0,48	0,02	0,30
X074	21,05	1,82	2,27	0,18	0,00
X075	21,10	0,22	0,26	0,00	0,00
X076	21,61	0,05	1,41	8,46	1,05
X077	21,69	1,50	0,00	0,77	0,00
X078	21,89	2,41	2,23	1,35	2,24
X079	21,93	0,00	0,00	0,00	0,01
X080	22,00	0,00	0,01	0,05	0,00
X081	22,16	0,00	0,04	0,00	0,00
X082	22,24	0,00	0,03	0,00	0,00
X083	22,46	0,18	0,16	0,27	0,24
X084	22,51	0,00	0,00	0,00	0,16
X085	22,59	1,39	1,85	0,04	0,02
X086	22,65	0,22	0,21	0,01	0,00
X087	22,72	0,09	0,12	0,00	0,00
X088	23,26	2,23	2,08	3,20	2,37
X089	23,37	0,00	0,00	0,33	0,00
X090	23,45	0,69	0,79	0,51	0,18
X091	23,88	17,60	20,21	0,08	5,21
X092	24,74	0,89	1,13	0,74	0,33
X093	24,79	0,00	0,00	0,23	0,00
X094	24,86	0,08	0,16	0,25	0,00
X095	25,30	2,37	2,72	0,28	1,35
X096	25,36	2,24	2,66	0,00	0,00
X097	25,53	0,08	0,14	0,00	0,00
X098	25,93	0,00	0,06	0,00	0,08
X099	26,01	0,00	0,02	0,02	0,00
X100	26,52	0,54	0,79	0,05	0,16
X101	26,64	1,87	1,86	0,11	0,06
X102	26,97	1,27	1,62	0,02	0,00

3.2. Analyses statistiques

3.2.1. Analyse en composante principale (ACP)

3.2.1.1. Diminution du nombre de variables par la technique d'Escoufier

L'analyse par la technique d'Escoufier nous montre que les 5 premières variables expliquent à elles seules 95,23% de la variance (tab. 4.). Le nombre de variables étudiées est donc réduit à ces 5 variables.

Tableau 4. Variance expliquée cumulée.

Nom de la variable	Variance expliquée cumulée
Variable74	RV=0.8153068
Variable48	RV=0.8906095
Variable85	RV=0.9218164
Variable19	RV=0.9277981
Variable66	RV=0.9523346

3.2.1.2. Résultats de l'analyse en composante principale

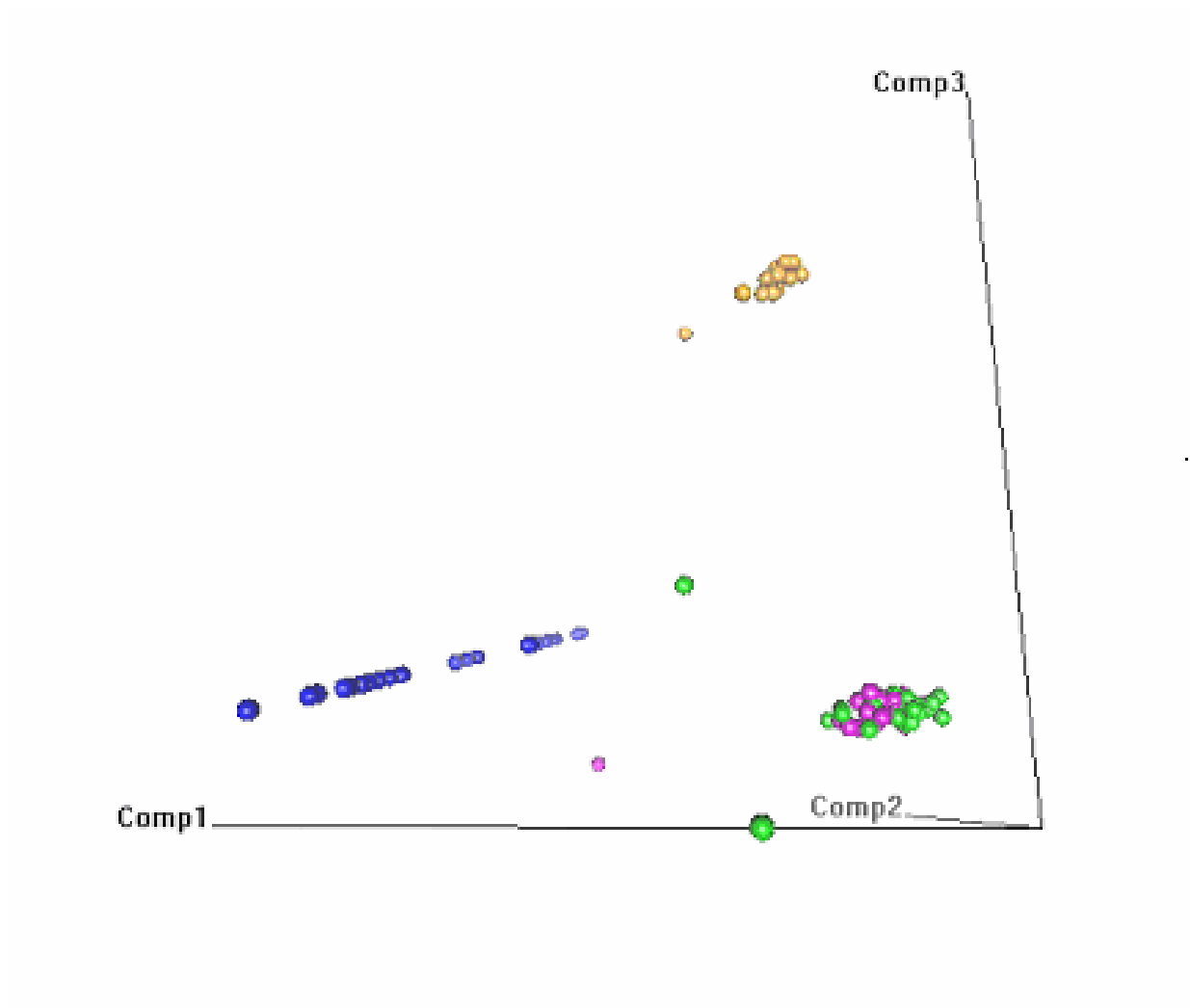


Figure 18. Graphique en 3 dimensions de L'ACP réalisée sur la matrice de données 99 individus X 5 variables. En bleu: *B. ter. dalmatinus* ; en orange: *B. ter. sassaricus* ; en vert: *B. ter. lusitanicus* ; en rose: *B. ter. terrestris*.

L'ACP est capable de constituer 3 groupes. Les *B. ter. dalmatinus* et les *B. ter. sassaricus* forment deux populations très bien isolées. Par contre le troisième groupe est constitué des *B. ter. terrestris* et *B. ter. lusitanicus* que l'analyse ne semble pas pouvoir distinguer.

Deux individus appartenant chacun à une de ces deux sous-espèces se trouvent relativement éloignés du nuage de points constitué. Il s'agit probablement de mâles plus âgés que la moyenne du groupe.

Les *B. ter. dalmatinus* forment un nuage très étiré, ce qui est probablement dû au gradient d'âge qui existe dans l'échantillon de cette sous-espèce (fig. 19.) et qui semble déterminé par l'axe 1 principalement.

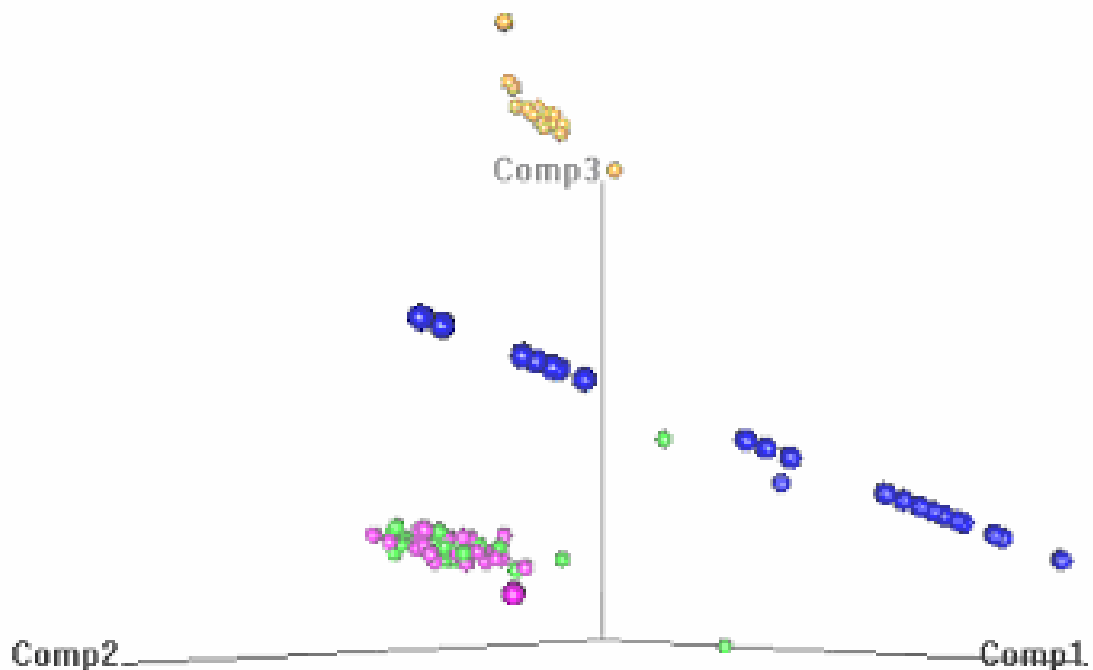


Figure 19. Graphique en 3 dimensions de L'ACP réalisée sur la matrice de données 99 individus X 5 variables. En bleu: *B. ter. dalmatinus* ; en orange: *B. ter. sassaricus* ; en vert: *B. ter. lusitanicus* ; en rose: *B. ter. terrestris*.

3.2.2. Analyse discriminante linéaire (ADL)

Contrairement à l'ACP, l'ADL discrimine parfaitement les 4 taxons (fig. 20.).

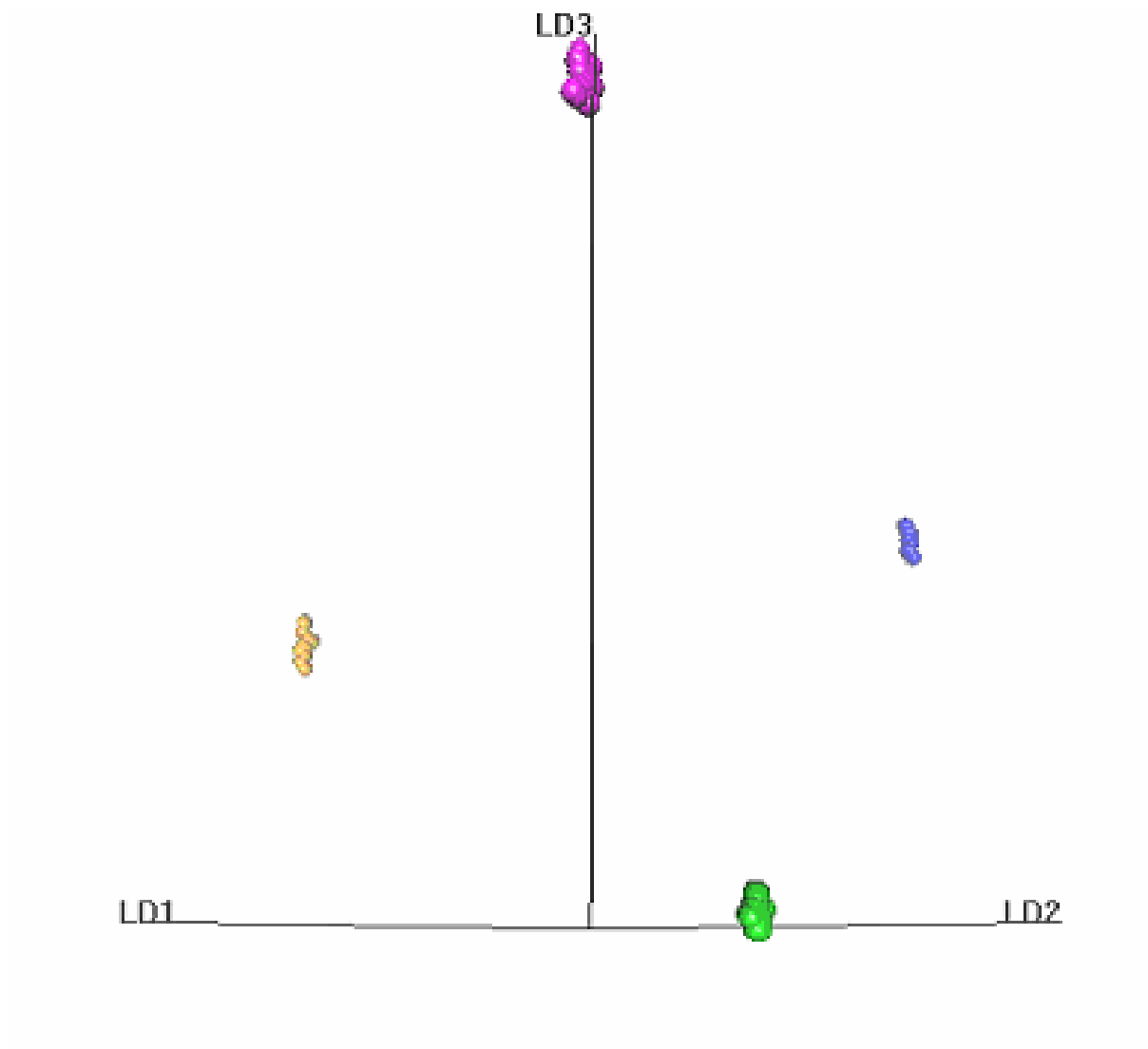


Figure 20. ADL en 3 dimensions. En vert: *B. ter. terrestris*; en bleu, *B. ter. dalmatinus*; en rose: *B. ter. lusitanicus*; en orange: *B. ter. sassaricus*.

Les molécules dont les poids sont les plus importants pour la position des axes dans l'espace sont:

X005 négativement et X047 positivement pour LD1

X048 négativement et X047 positivement pour LD2

X047 négativement et X048 positivement pour LD3

Ce sont donc principalement ces 3 molécules qui permettent la discrimination des taxons.

Une matrice de confusion a été appliquée aux résultats de cette analyse. Il s'agit d'un tableau de contingence à double entrée qui croise les groupes prédits par l'ordinateur avec les groupes prédits manuellement pour ces mêmes objets. En cas de concordance, les objets sont dénombrés sur la diagonale de cette matrice carrée. Les objets placés en dehors de cette diagonale sont donc des erreurs.

	<i>dalmatinus</i>	<i>lusitanicus</i>	<i>sassaricus</i>	<i>terrestris</i>
<i>dalmatinus</i>	25	0	0	0
<i>lusitanicus</i>	0	27	0	0
<i>sassaricus</i>	0	0	20	0
<i>terrestris</i>	0	0	0	27

Le taux global de séparation des groupes (taux de reclassement des objets dans la classe correcte) est ici de 100%.

3.2.3. Méthode de groupement hiérarchique

3.2.3.1. Rpratt dans R

Le logiciel sépare de façon dichotomique les groupes sur base de la matrice de données brutes. Hormis un spécimen de *B. ter. lusitanicus* et un spécimen de *B. ter. terrestris*, les 97 autres mâles sont séparés de manière cohérente et sont replacés avec les individus de leur sous-espèce respective (fig. 21.).

Il est possible que nous ayons à faire à deux mâles plus âgés que les autres et qui, dès lors, ne sont pas assignés correctement au groupe prédit par la méthode.

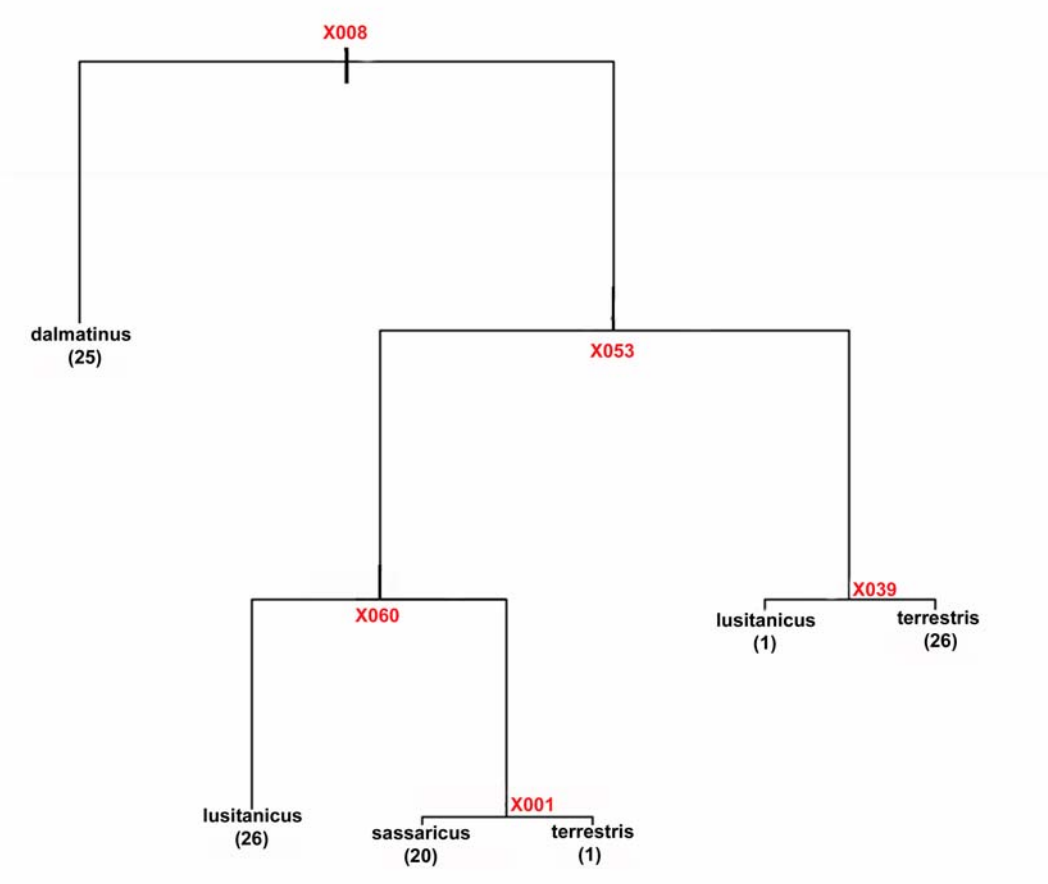


Figure 21. Dendrogramme obtenu par Rpratt à partir de la matrice de données brute, les molécules qui permettent la séparation dichotomique sont indiquées en rouge.

3.2.3.2. NTSys

Un lien UPGMA est appliqué à la matrice de corrélation calculée à partir de la matrice de données brutes transformée et standardisée (fig. 22.).

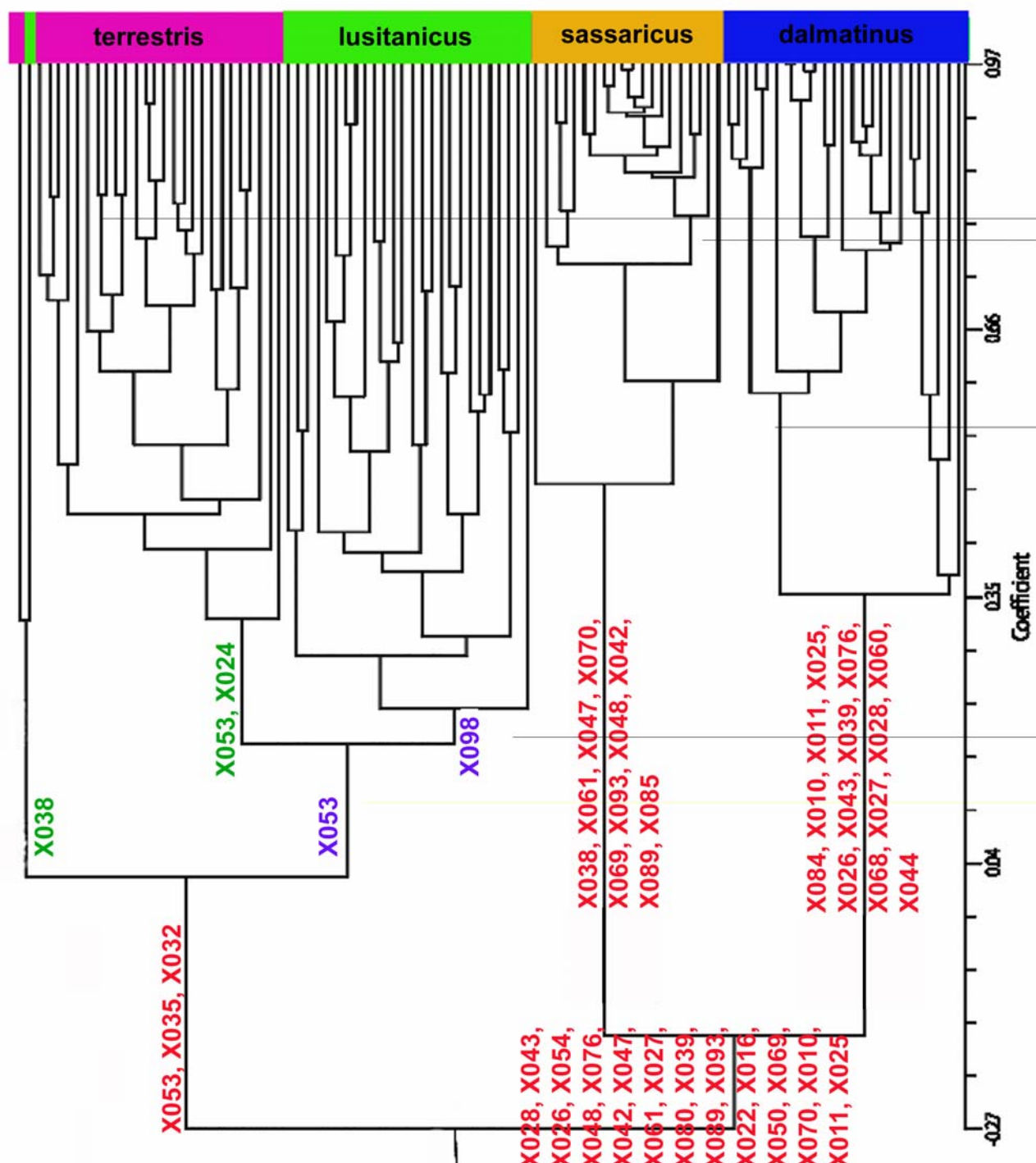


Figure 22. Lien UPGMA de la corrélation de Pearson calculée sur la matrice de données transformée et standardisée. Les molécules qui permettent la séparation des groupes sont notées en vert quand $\alpha=0.05$; en bleu quand $\alpha=0.01$ et en rouge quand $\alpha=0.001$.

4 groupes bien distincts sont formés par le lien.

La première séparation s'effectue entre les bourdons qui appartiennent à *B. ter. lusitanicus* et *B. ter. terrestris* et les autres (*B. ter. sassaricus* et *B. ter. dalmatinus*).

Ensuite, le logiciel sépare les *B. ter. terrestris* des *B. ter. lusitanicus*. Au sein des *B. ter. terrestris*, un groupe de deux individus se forme, on retrouve ici probablement les deux individus plus âgés qui étaient hors de leur groupe respectif dans le dendrogramme issu de Rpratt.

Enfin, les *B. ter. sassaricus* se séparent des *B. ter. dalmatinus*.

Cette analyse donne donc des résultats cohérents avec les autres méthodes statistiques utilisées ici.

La méthode Indval est finalement appliquée sur le dendrogramme obtenu avec NTSys. Cela permet d'identifier les variables qui sont importantes pour la séparation des groupes aux différents embranchements.

On remarque que la séparation entre les sous-espèces pyrénéennes et les autres s'effectue sur base d'un grand nombre de molécules, il en est de même pour la distinction entre les sous-espèces *B. ter. dalmatinus* et *B. ter. sassaricus*.

Au contraire, seulement une ou deux molécules différencient les *B. ter. terrestris* des *B. ter. lusitanicus*.

Le groupe de deux individus probablement plus âgés, un *B. ter. terrestris* et un *B. ter. lusitanicus*, se distingue des autres mâles pyrénéens par la présence d'un seul composé, le X038.

4. Discussion

4.1. Chromatogrammes

Comme démontrés dans les résultats, les chromatogrammes des 4 taxons étudiés, bien que fort semblables, diffèrent par plusieurs aspects.

L'abondance relative du DHTF, considéré comme la molécule majeure de l'espèce. En comparaison avec les résultats obtenus par Terzo *et al.* (2005) chez *Bombus ruderarius ruderarius* et *B. rud. montanus* (2 sous-espèces sympatriques), les différences observées ici sont énormes. Les 7 composés majeurs déterminés par Terzo *et al.* (2005) varient au maximum de 2,40% alors que dans chez les taxons étudiés dans le cadre de ce travail, les différences sont de l'ordre de 38,60%.

Certaines molécules sont communes à 2, 3 ou tous les taxons, alors que d'autres sont caractéristiques d'un seul des 4 taxons. La molécule majeure de l'espèce est commune aux 4 taxons étudiés. Il est intéressant de noter que les sous-espèces *B. ter. terrestris* et *B. ter. lusitanicus* ont comme molécule majeure le X091, ce qui correspond au profil d'un mâle plus âgé (environ 20 jours) chez *B. ter. dalmatinus* (Coppée, 2005). D'autre part, les composés moyens (> 5%) sont toujours présents dans les 4 taxons étudiés, même à l'état de trace, à l'exception du X005 qui n'est présent que chez les 2 sous-espèces récoltées dans les Pyrénées. Les différences les plus importantes se situent donc au niveau des composés mineurs.

Les deux taxons pyrénéens possèdent 61 molécules communes dont 59 dans les mêmes proportions. La sous-espèce *lusitanicus* présente 11 molécules que la sous-espèce *terrestris* ne possède pas et la sous-espèce *terrestris* en possède 5 ; qu'elles soient présentes ou non chez les 2 autres sous-espèces.

4.2. Analyses statistiques

Quelle que soit la méthode statistique appliquée à la matrice de données, les résultats obtenus concordent. Les points suivants peuvent être mis en évidence.

L'analyse discriminante linéaire sépare parfaitement les 4 taxons, sans recouvrement entre eux. Trois molécules sont importantes pour permettre cette distinction: X005, X047 et X048.

On peut néanmoins remarquer que les deux sous-espèces récoltées dans les Pyrénées sont plus proches entre elles dans l'espace tridimensionnel que des autres.

Les méthodes de groupement appliquées ici font également la distinction entre les quatre taxons, mais deux individus des sous-espèces collectées dans les Pyrénées, sont séparés de leur groupe respectif. Ces deux individus, caractérisés par la molécule X038, sont probablement des individus plus âgés que les autres.

L'analyse en composante principale forme 3 groupes constitués de *B. ter. sassaricus*, *B. ter. dalmatinus* et des 2 sous-espèces de la population hybride Pyrénéenne qui forment un seul nuage de points. Les résultats de cette analyse mettent en évidence la distance géographique, et probablement génétique, qui existe entre les taxons.

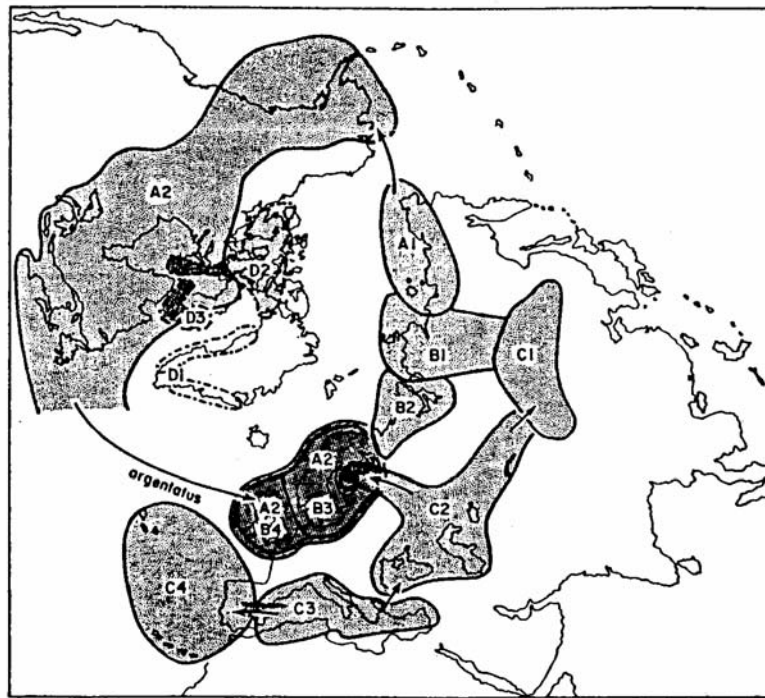
Suivant le concept de reconnaissance des espèces de Paterson (Paterson, 1993), il est naturel que les spécimens qui proviennent de populations hybrides de *B. ter. terrestris* et *B. ter. lusitanicus*, aient un SMRS proche. En effet, puisqu'elles s'hybrident librement, elles doivent partager un même SMRS. De même, les deux autres sous-espèces possèdent des sécrétions des glandes labiales céphaliques qui, statistiquement, les séparent l'une de l'autre. *B. ter. sassaricus* de Sardaigne, n'a que très peu de possibilité d'hybridation avec d'autres sous-espèces. Elle peut uniquement rencontrer *B. ter. xanthopus* à l'extrême nord de l'île. Quant à *B. ter. dalmatinus*, les possibilités qu'il ait pu y avoir une hybridation depuis sa mise en élevage sont quasiment nulles (Rasmont, comm. pers.). Le flux génétique qui implique les populations étudiées pour ces deux sous-espèces est donc très faible.

Au contraire, les deux taxons présents aux Pyrénées présentent des sécrétions labiales céphaliques très proches et sont connus pour s'hybrider sur leurs territoires communs (le Languedoc). Cela conforte les résultats qui montrent qu'il existe une cline morphologique, indicatrice d'une cline génétique, du Sud de la France jusqu'au Danemark (Estoup *et al.*, 1996). En effet, si les populations qui peuplent l'Europe de l'ouest, du nord au sud s'hybrident entre-elles comme le font *B. ter. terrestris* et *B. ter. lusitanicus* dans les Pyrénées, leur SMRS ne doit pas varier énormément, puisqu'elles sont capables de se reconnaître. Les sécrétions de leurs glandes labiales céphaliques sont donc quasiment identiques.

Au vu des résultats statistiques obtenus et sur base de la liste des molécules des 4 taxons étudiés, il est possible de confirmer le statut sub-spécifique de ceux-ci. Néanmoins, les spécimens récoltés dans les Pyrénées peuvent être considérés comme une seule population qui résulte d'une hybridation et présente deux colorations différentes des soies des corbeilles de récolte.

Il se peut que nous soyons en présence d'un artenkreiss, ou cercle d'espèces. Cette forme de spéciation a été définie par Rensch en 1929. Le modèle suivant peut plus que probablement aider à la compréhension des variations des sécrétions des glandes labiales céphaliques observées dans cette étude.

Le cas de la spéciation du Goéland argenté en est un exemple (fig. 23.). Cette espèce se distribue tout le long du cercle arctique en plusieurs populations qu'on peut reconnaître à de petites nuances dans la coloration du plumage. 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 les petites variations interpopulationnelles de SMRS (la couleur du plumage) qui ne permettent plus la reconnaissance spécifique entre individus provenant de populations éloignées.



Chevauchement circulaire chez les Goélants du groupe *Larus argentatus*. Les sous-espèces *A*, *B*, *C* ont évolué dans les refuges du Pléistocène ; *D* a évolué en Amérique du Nord en une espèce distincte (*L. glaucoides*). Quand *A* s'est répandu au post-Pléistocène, à partir, probablement d'un refuge du Pacifique nord (Yukon ? Alaska ? Kamtchatka ?), il a traversé toute l'Amérique du Nord et est arrivé à l'ouest de l'Europe (*argentatus*). Il devint là sympatrique de *fuscus* (*B3*, *B4*), population la plus occidentale de la chaîne des populations eurasiennes.

Figure 23. Distribution géographique en Artenkreiss du goéland argenté. D'après Mayr (1974).

5. Conclusion

Les 4 taxons étudiés semblent bien appartenir à la même espèce, *Bombus terrestris*. Elles conservent en effet les mêmes molécules majeures. Toutefois, les sécrétions des glandes labiales céphaliques sont assez différentes pour pouvoir être statistiquement distinguées. Cette variation observée traduit la distance géographique qui sépare les taxons.

Les deux taxons pyrénéens sont confondus lorsqu'on applique une ACP à la matrice de données brutes, ce qui confirme les observations d'hybridations qui ont été effectuées au préalable.

Les points communs et les différences observés dans la constitution des sécrétions des glandes labiales céphaliques invitent à émettre l'hypothèse que l'espèce étudiée possède une conformation en artenkreiss, comme chez le Goéland argenté.

6. Perspectives

Il serait judicieux d'étudier les autres taxons qui constituent l'espèce utilisée comme modèle pour cette étude. Des populations de la même sous-espèce, mais provenant de différents endroits pourraient également être comparées. Par exemple, il serait intéressant d'étudier des populations de *B. ter. terrestris* de Belgique, du centre de la France et du Languedoc, c'est-à-dire en différents points de la cline morphologique observée.

D'autre part, une analyse génétique de ces populations permettrait de mettre en relation la variabilité géographique du SMRS et celle due à l'histoire des peuplements.

7. Annexes

7.1. Annexe 1. : Script pour effectuer l'ACP avec le logiciel R.

```
# importer le fichier texte, entre () le chemin du fichier,

# remplacer les \ par/, ajouter .txt

"nom de fichier" <- read.table("Z:/DEA/Tab_aires_chromatos/Tableaux
comparatifs/Tab_surfaces_4spp_transp.txt", header=TRUE, sep="", na.strings="NA",
dec=",", strip.white=TRUE)

edit("nom de fichier")

#standardisation et transformation

"nom de fichier".l <- log1p("nom de fichier" [2:42])# Log

edit("nom de fichier".l)

# - moyenne / ecart-type

# ecart-type

"nom de fichier".ls <- apply("nom de fichier".l, 2, scale)

invisible(edit("nom de fichier".ls))

#moyenne

"nom de fichier".ls <- apply("nom de fichier".ls, 2, mean)

edit("nom de fichier".ls)

#Escoufier

library (pastecs)

"nom de fichier".ls.esc <- escouf("nom de fichier".ls)

plot("nom de fichier".ls.esc)

# selection des variables pour ACP
mary("nom de fichier".ls.esc)

sumAs <- "nom de fichier".ls[ , c("17, 32, 7,... variables conservées séparées par une
virgule")]
```

```
# selection des variables pour ACP
```

```
"nom de fichier" <- "nom de fichier".ls[ , c("17, 32, 7,... variables conservées séparées  
par une virgule")]
```

```
edit("nom de fichier")
```

```
#ACP
```

```
library(MASS)
```

```
("nom de fichier".pc <- princomp ("nom de fichier".ls, cor = TRUE))
```

```
summary("nom de fichier".pc)
```

```
plot("nom de fichier".pc)
```

```
biplot("nom de fichier".pc, choices=c(1,2))
```

```
# calcul de la variance expliquée
```

```
"nom de fichier".pc$sdev^2
```

```
#%
```

```
(contrib <- "nom de fichier".pc$sdev^2/sum ("nom de fichier".pc$sdev^2)*100)
```

```
#graph des %
```

```
barplot (contrib)
```

```
##% de la variance cumulés
```

```
cumsum (contrib)
```

```
#Projection des individus sur les axes
```

```
("nom de fichier".ind <- predict ("nom de fichier".pc))
```

```
#coordonnées des individus
```

```
plot("nom de fichier".ind[, 1], "nom de fichier".ind[, 2], col = as.numeric("nom de  
fichier"$species))
```

```
#Espace des variables
```

```
#coefficients qui permettent de projeter les axes
```

```
("nom de fichier".ld = loadings ("nom de fichier".pc))
```

7.2. Annexe 2. : Script pour effectuer l'ADL avec le logiciel R.

```
# importer le fichier texte, entre () le chemin du fichier,

# remplacer les \ par/, ajouter .txt

"nom du fichier" <- read.table("Z:/DEA/Tab_aires_chromatos/Tableaux
comparatifs/Tab_surfaces_4spp_transp.txt", header=TRUE, sep="\t",
na.strings="NA", dec=".",

strip.white=TRUE)

attach("nom du fichier")

edit("nom du fichier")

# S'il y a une colonne 'X' au début

"nom du fichier" <- "nom du fichier"[, -1]

#standardisation et transformations

"nom du fichier".l <- log1p("nom du fichier"[, 1:49])# Log

edit("nom du fichier".l)

# - moyenne / ecart-type

# ecart-type

"nom du fichier".ls <- apply("nom du fichier".l, 2, scale)

invisible(edit("nom du fichier".ls))

#moyenne

"nom du fichier".ls.mean <- apply(AS.ls, 2, mean)

"nom du fichier".ls.mean

# Rajout des classes après standardisation

"nom du fichier". <- as.data.frame("nom du fichier".ls)

"nom du fichier". <- cbind("nom du fichier"., species = "nom du fichier"[, 50])

names("nom du fichier".)

# Analyse lda

library(MASS)
```

```
"nom du fichier".lda <- lda(species ~ ., data="nom du fichier".)

"nom du fichier".lda

plot("nom du fichier".lda)

# Valeurs propres- coord des objet sur les axes

("nom du fichier".ind <- predict ("nom du fichier".lda, dimen = 4))

# Matrice de confusion sur l'ensemble

"nom du fichier".conf <- table(predicted="nom du fichier".ind$class, observed="nom
du fichier"$species)

"nom du fichier".conf

# Taux global de séparation des groupes

sum(diag("nom du fichier".conf)) / sum("nom du fichier".conf) * 100

# Graphe des deux premiers axes discriminants

coord <- "nom du fichier".ind$x[, c(1, 2)]

plot(coord)

# Indication des zones attribuées à chaque groupe dans le plan des deux premières
composantes

"nom du fichier".rnd <- runif(49*10000)

"nom du fichier".rnd <- matrix(runif(49*10000), ncol = 49)

"nom du fichier".rnd <- as.data.frame("nom du fichier".rnd)

names("nom du fichier".rnd) <- names("nom du fichier".[, -50])

"nom du fichier".rnd <- as.data.frame(apply("nom du fichier".rnd, 2, scale))

"nom du fichier".rnd.pred <- predict("nom du fichier".lda, newdata = "nom du
fichier".rnd, dimen = 2)

# Représenter les zones de contour, les points, les centroides et les ellipses de
confiance à 95%

eqscplot(coord, type = "n", xlab = "LD1", ylab = "LD2")

for (i in 1:length(levels("nom du fichier".$species))) {

Pts <- "nom du fichier".rnd.pred$x[as.numeric("nom du fichier".rnd.pred$class) == i,
```

```

]

Hull <- chull(Pts)

Hull <- c(Hull, Hull[1])

lines(Pts[Hull, ], col = i, lty = 2)

}

text(coord, labels = as.character("nom du fichier".$species), col = "gray", cex = 0.7)

# ellipses de confiance autour des groupes

for (i in 1:length(levels("nom du fichier".$species))) {

coord.i <- coord[as.numeric("nom du fichier".$species) == i, ]

data.ellipse(coord.i, levels = 0.95, center.pch = 3, plot.points = FALSE,

add = TRUE, col = i, lwd = 1)

}

names ("nom du fichier".ind3$x)

# Graphe en 3D des 3 premiers axes de la LDA

("nom du fichier".ind3 <- predict ("nom du fichier".lda, dimen = 3))

coord3D <- "nom du fichier".ind3$x[, 1:3]

coord3D <- as.data.frame(coord3D)

coord3D$species <- "nom du fichier"$species

scatter3d(coord3D$LD1, coord3D$LD3, coord3D$LD2, group=coord3D$species,

surface=FALSE, bg="white", grid=FALSE, xlab="LD1", ylab="LD3", zlab="LD2")

# Scatterplot matrix des 3 premiers axes

scatterplot.matrix(~LD1+LD2+LD3 | species, reg.line=FALSE, col=rainbow(14),

smooth=FALSE, span=0.5, diagonal= 'none', by.groups=FALSE, data=coord3D)

# Analyse Rpart (arbre de classification)

library(rpart)

"nom du fichier".tree <- rpart(species ~ ., data = "nom du fichier".,

control=rpart.control(minsplit=1, cp=.0001, maxdepth=30))

```

```
plotcp("nom du fichier".tree)
```

```
plot("nom du fichier".tree)
```

```
text("nom du fichier".tree, use.n = TRUE, cex= .7)
```

8. Bibliographie

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts, K. & Watson, J. D., 1989. *Biologie moléculaire de la cellule*, Flammarion, Paris, 1990 et 1992 (2^{ème} édition), 1220.
- 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., 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.
- Cassier P., Bohatier J., Descoins C., Nagnan-Le Meillour., 2000. *Communication chimique et environnement*. Sciences Belin Sup., Paris, 256.
- 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.
- 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 pp.
- Dufrêne M. & Legendre P., 1997. Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67: 345-366.
- 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.
- Estoup A., Solignac M., Cornuet J.-M., Goudet J. & Scholls A., 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe, *Molecular Ecology*, 5:19-31.
- 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.

- Mayr E., 1963.** *Animal species and Evolution*. Belknap Press, Cambridge.
- Mayr E., 1974.** *Populations, espèces et evolution*. Hermann, 496.
- Paterson H. E. H., 1993.** *Evolution and the recognition concept of species*, The Johns Hopkins University Press, 234 pp.
- R Development Core Team, 2004.** *R: a language and environnement for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rasmont P., 1983.** Catalogue commenté des Bourdons de la region ouest paléarctique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Notes fauniques de Gembloux* 7 : 1-72.
- Rasmont P., Terzo M., Aytakin A. M., Hines H., Urbanova K., Cahlikova L. & Valterova I., 2005.** Cephalic secretions of the bumblebees subgenus *Sibiricobombus* Vogt suggest *Bombus niveatus* Kriechbaumer and *Bombus vorticosus* Gerstaecker are conspecific (Hymenoptera, Apidae, Bombus). *Apidologie* 36: 571-584.
- Rasmont P., Verhaeghe J.C., Rasmont R. & Terzo M., in prep.** *West-Palearctic Bumblebees*.
- 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.
- Rench B., 1929.** *Das prinzip geographischer Rassenkreise und das problem der Artbildung*. Bornträger, Berlin.
- Rholf F. J., 1993.** *NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 1.80*. Applied biostatistic Inc., New York, 241 + VII.
- Schremmer F., 1972.** Beobachtungen zum Paarungsverhalten der Männchen von *Bombus confusus* Schenk., *Z. Tierpsychol.* 31: 503-512.
- Svensson Bo G., 1979.** Patrolling behaviour of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae) in a subalpine/alpine area, Swedish Lapland. *Zoon* 7: 67-94.
- 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.
- Tomassone R., 1988.** *Comment interpréter les résultats d'une analyse factorielle discriminante ?*, ITCF, 56pp.
- Van Gansen P. & Alexandre H., 1997.** *Biologie général*, Dunod, Paris, 512.
- Wilson E.O. & Brown W. L. Jr, 1953.** The subspecies concept and its taxonomical application. *Systematic Zoology* 2 (3): 97-111.
- Wilson E. O., 1974.** *La sociobiologie*, Le Rocher, Monaco, 679.