

UNIVERSITE DE MONS

-

FACULTE DES SCIENCES

-

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Influence de la maturation des ovarioles sur les profils
stéroliques d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae)**

Directeur de mémoire
Dr. Denis Michez

Mémoire de fin d'Etudes
présenté par **Gaëlle Carreaux**
En vue de l'obtention du grade
de **Maître en Biologie des
Organismes et Ecologie**

Année académique 2010-2011

G. Carreaux, 2011. *Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroliques d'Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae). Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université Mons-Hainaut, 86p.

Résumé: Actuellement, la compréhension des interactions plante-abeille et de leurs mécanismes reste encore très incomplète. Les facteurs diététiques pourraient y jouer un rôle clef, en particulier l'hypothèse d'une contrainte évolutive liée aux stérols sur les choix alimentaires des abeilles. *Andrena vaga* (Panzer) est une espèce solitaire printanière psammophile, oligolectique sur *Salix* sp. (Salicaceae). Une précédente étude a permis de mettre en évidence, dans les profils stéroliques des femelles d'*Andrena vaga*, une grande variabilité intraspécifique ainsi que la présence d'un stérol particulier encore non identifié de masse 496 (Inc. 496).

D'après les analyses stéroliques micro-quantitatives et les illustrations histologiques, il semble qu'*Andrena vaga* métabolise ce stérol particulier lorsqu'elle a besoin de son hormone de mue notamment pour la maturation de ses ovaires ainsi que la maturation des œufs.

Une analyse des ecdystéroïdes a pu montrer qu'*Andrena vaga*, en plus de métaboliser ce stérol particulier, synthétise également une hormone de mue différente de celle synthétisée par *Apis mellifera* (L.) et *Colletes cunicularius* (L.), une autre abeille solitaire qui butine le saule.

Mots-clés: *Andrena vaga*, *Salix* sp., spécialisation alimentaire, stérols, maturation des ovarioles.

Remerciements

Je remercie le Professeur Pierre RASMONT de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Zoologie.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements au Docteur Denis MICHEZ pour avoir dirigé ce mémoire et de m'avoir conseillé tout au long de sa rédaction.

Je tiens également à remercier le Professeur Georges LOGNAY (Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux) pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du laboratoire de Chimie Analytique.

Je remercie le service de Biologie marine de m'avoir autorisée à utiliser leur matériel pour mes illustrations histologiques.

Je tiens à remercier Michal PAROULEK, du service de Biochimie Analytique du centre Biologique de l'Académie des Sciences de la République Tchèque pour son aide précieuse ainsi que Irena VALTEROVA, de l'Institut de Chimie Organique et de Biochimie de Prague pour son accueil.

Je remercie le Professeur Pierre RASMONT, du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons, le Professeur Georges LOGNAY, du Laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux ainsi que le Professeur Ruddy WATTIEZ, du service de Protéomique et Biochimie des Protéines de l'Université de Mons, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Que soient ici remerciés tous les membres de l'équipe du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons pour leur écoute, leur disponibilité et leur aide, en particulier Maryse VANDERPLANCK.

Je remercie Audrey COPPEE pour sa bonne humeur, son aide et ses précieux conseils lors de mon séjour à Prague.

Je suis aussi très reconnaissante envers mes amis Romain, Elodie, Mathias et Gaëtan pour avoir su apporter des rires et de la bonne humeur chaque jour de cette année.

Je remercie enfin Andrew, ma famille et mes amis pour leur soutien et leurs encouragements.

Table des matières

1. Introduction	6
1.1. Les abeilles solitaires	6
1.1.1. Diversité et systématique	6
1.1.2. Cycle de vie des abeilles	8
1.1.3. Spécialisation alimentaire	12
1.2. Métabolisme stérolique	15
1.3. Métabolisme stéroïdique	19
1.4. Appareil reproducteur femelle	21
1.5. Oogenèse	23
1.6 Objectif	28
1.7 Modèle biologique	29
2. Matériel et méthode	35
2.1 Echantillonnage	35
2.1.1. Grande Bruyère de Blaton	35
2.1.2 Collecte des femelles	36
2.1.3 Collecte de pollen	37
2.2 Histologie	38
2.2.1 Préparation des échantillons	38
2.2.2 Préparation des coupes	39
2.3 Analyses stéroliques micro-quantitatives	41
2.3.1 Préparation des échantillons	41
2.3.2 Analyse des échantillons	42
2.4 Analyse des photographies	44
2.5 Analyses des ecdystéroïdes	45
2.6 Analyses statistiques	47
3. Résultats	48
3.1 Ressource alimentaire	48
3.2 Histologie	49
3.3 Stérols	56
3.2.1 Pollen scopal	56
3.2.2 Femelles non émergées	58
3.2.3 Femelles émergées	60
3.3.4 Variabilités	63

3.4 Développement ovarien	64
3.5 Ecdystéroïdes	64
3.6 Statistique	66
3.6.1 ANOVA	66
3.6.2 ACP	66
3.5.3. Analyse de classification hiérarchique	70
4. Discussion	72
4.1 Composition des ressources en pollen d' <i>Andrena vaga</i>	72
4.2 Lien entre le développement ovarien et la composition stérolique	73
4.3 Métabolisme des stérols chez <i>Andrena vaga</i>	73
5. Conclusion	75
6. Perspectives	76
7. Bibliographie	77
8. Annexe	85

1. Introduction

1.1. Les abeilles solitaires

1.1.1. Diversité et systématique

Les abeilles font partie de la superfamille des Apoidea, elle-même appartenant au groupe des Aculéates, au sous-ordre des Apocrites et à l'ordre des Hyménoptères. Il est nécessaire de faire la distinction entre les apoïdes apiformes et les apoïdes sphéciformes. Le premier groupe comprend les abeilles au sens large. Le second groupe comprend les guêpes fouisseuses.

Les abeilles présentent de nombreux caractères dérivés communs, elles constituent donc un groupe monophylétique (Alexander, 1992 ; Wcislo & Cane, 1996 ; Paxton, 2005) (Fig.1). Plusieurs caractères dérivés sont liés au mode de vie totalement végétarien des abeilles.

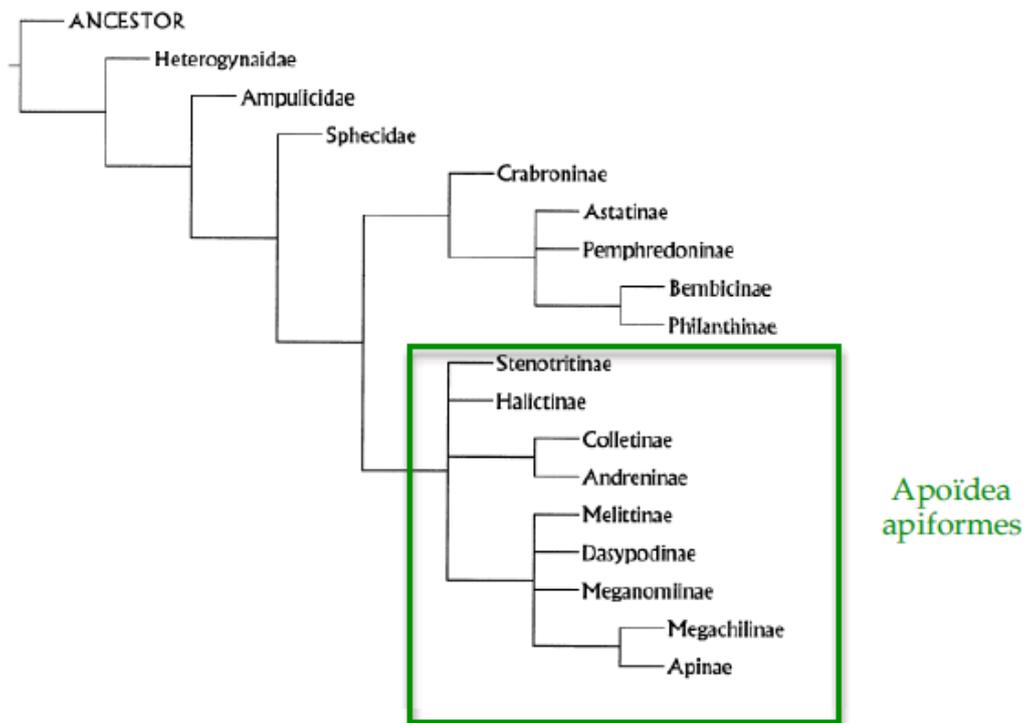


Figure 1 : Cladogramme des Apoidea montrant la monophylie des Apoidea apiformes (d'après Brothers, 1999)

Le nombre d'espèces d'abeilles décrites, pour le moment, dans le monde est de 17 000. Ce nombre pourrait encore augmenter et se rapprocher de 30 000 grâce aux nouvelles méthodes moléculaires et aux analyses morphologiques. Ces espèces sont regroupées en 443 genres et réparties dans 9 familles (Michener, 2007).

Les apoïdes apiformes se scindent en deux groupes selon la morphologie de leurs pièces buccales (Fig.2). D'un côté, le groupe des langues courtes regroupe les Colletidae, les Andrenidae, les Halictidae, les Melittidae, les Meganomiidae, les Stenotritidae et les Dasypodaïdae. Et de l'autre, les langues longues qui comprennent les Megachilidae et les Apidae.

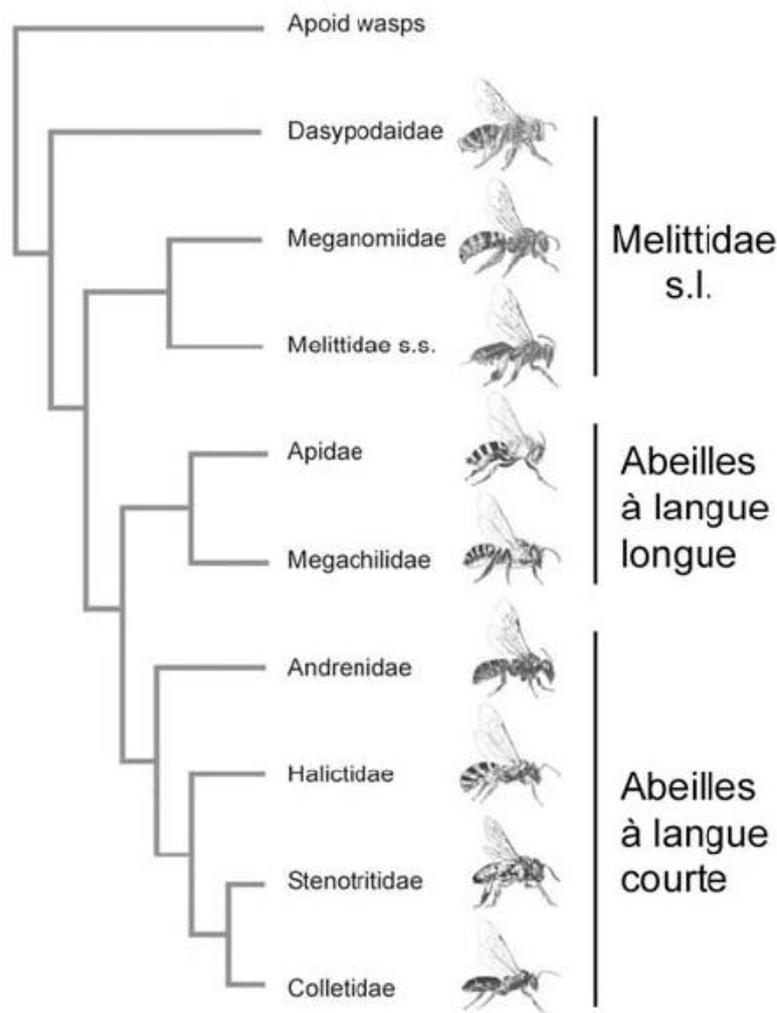


Figure 2 : Cladogramme des Apoïdes distinguant les clades à langue longue de ceux à langue courte (d'après Danforth *et al.*, 2006 et Michez, 2007)

1.1.2. Cycle de vie des abeilles

Bien que l'attention générale se tourne vers une espèce sociale, l'abeille mellifère, 85% des abeilles décrites sont solitaires (Paxton, 2005).

Lorsque les femelles émergent de leurs cellules larvaires, elles copulent très vite. Le reste de leur vie est alors dédié à la construction du nid et l'approvisionnement en nourriture des cellules larvaires (Paxton, 2005)

Il existe de nombreux types de nids construits par les abeilles solitaires. Certains de ces nids sont creusés dans le sol (Fig.3), d'autres dans des tiges de plantes (Fig.4) ou dans du bois mort (Fig.5) et d'autres encore dans des cavités préexistantes telles que des coquilles d'escargot (Fig.6) ou des terriers creusés par d'autres insectes (Wcislo & Cane, 1996 ; Pouvreau, 2004). Ces nids comportent une ou plusieurs loges. Chaque loge forme une cellule larvaire dont les parois sont parfois tapissées d'une sécrétion hydrophobe par les femelles. Cette sécrétion est issue de la glande de Dufour, glande située dans l'abdomen de l'abeille (Wcislo & Cane, 1996). La plupart des abeilles solitaires préfère nidifier à proximité des ressources florales. Certaines espèces forment des agglomérations en creusant leurs nids proches les uns des autres. Ces agglomérations peuvent être temporaires ou définitives (Pouvreau, 2004)

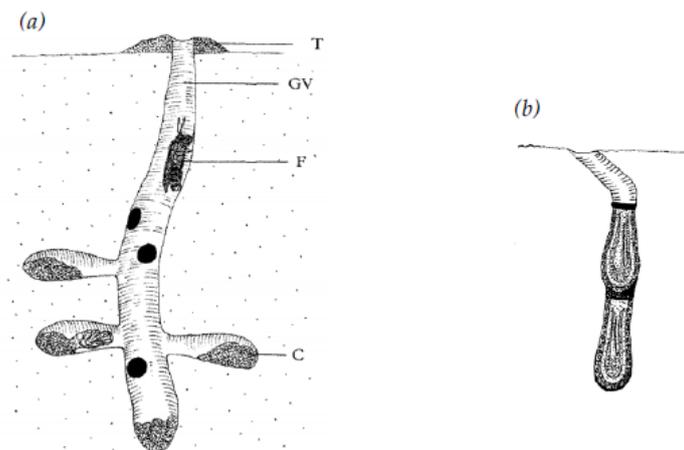


Figure 3: (a) Nid d'halicte (*Halictus maculatus*, Halictidés). C: cellule; F: femelle d'halicte; GV: galerie verticale; T: tumulus. (b) Nid terricole d'*Anthocopa cristatula* (Osmiini, Mégachilidés) (d'après Pouvreau, 2004)



Figure 4 : Nid rubicole d'*Anthocopa ligurica* (Osmini, Mégachilidés)
(d'après Pouvreau, 2004)

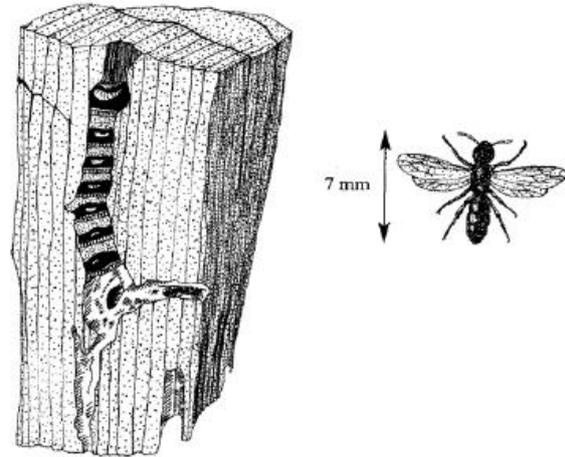


Figure 5 : Nid d'*Heriades sp.*
(Mégachilidés) dans un morceau de bois (d'après Pouvreau, 2004).

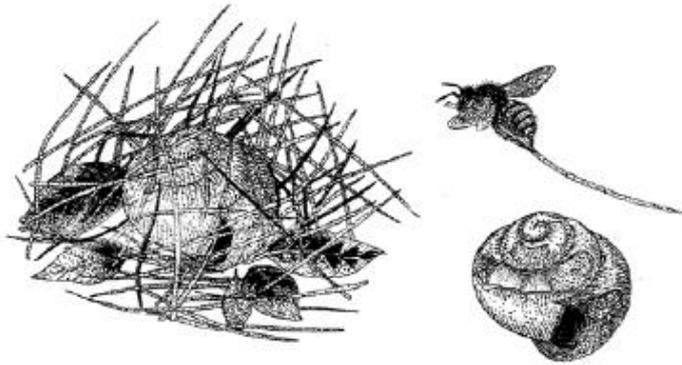


Figure 6 : Nid d'Osmie
(*Osmia bicolor*,
Mégachilidés) dans une
coquille d'escargot
dissimulée sous des
brindilles sèches (d'après
Pouvreau, 2004).

La plupart des abeilles solitaires prépare une sorte de pâte faite d'un mélange de pollen et de nectar qu'elles déposent dans le fond des cellules pour nourrir les larves. Certaines espèces telles que les Collètes ingèrent le pollen et le régurgitent, mélangé à du nectar, dans les cellules. D'autres, telles que les abeilles à mortier (chalicodome), préparent un mélange de miel et pollen liquide (Pouvreau, 2004).

Au cours de son cycle de vie, l'abeille traverse 4 stades principaux que sont l'œuf, la larve, la puppe et enfin l'imago.

L'abeille pond généralement un œuf par cellule. Sa taille est particulièrement petite compte tenu de l'adulte qu'il deviendra (Winston, 1987). Si l'œuf est fécondé, il donnera naissance à une femelle diploïde et dans le cas contraire, à un mâle haploïde.

L'œuf est blanc, cylindrique, de forme ovale allongée et légèrement incurvé. L'extrémité destinée à devenir la tête est légèrement plus grosse que l'extrémité abdominale (Winston, 1987).

Au bout de quelques jours, l'œuf éclot en un premier stade larvaire par dissolution de sa membrane. Seules les abeilles éclosent par dissolution de la membrane et pas en la déchirant (Winston 1987 citant DuPraw 1961 1967). Un œuf mesure entre 1,3 et 1,8 mm de long et pèse de 0,12 à 0,22 mg chez *Apis mellifera*.

Les temps de développement, la taille et les poids sont fonction de l'espèce, de la lignée et des conditions climatiques (Winston, 1987).

La larve a la forme d'un petit ver, constitué presque exclusivement d'un tube digestif et adapté à une croissance rapide. Elle passe presque tout son temps à manger la nourriture déposée par l'adulte. Elle est également capable de se retourner si la nourriture n'est pas directement à proximité de sa bouche (Winston, 1987). La durée du stade larvaire est variable.

Le développement de l'abeille nécessite 6 mues dont 5 pendant l'état larvaire et la dernière lorsqu'elle émerge. La fréquence des mues est très variable mais une larve peut muer une fois par jour, ce qui lui permet de grandir rapidement en perdant son exosquelette devenu trop petit (Winston, 1987).

Les derniers jours de la vie larvaire sont consacrés à l'élaboration d'un cocon grâce à ses filières. Filières, qui, chez l'adulte deviendront les glandes salivaires thoraciques. Ce dernier stade larvaire est considéré comme étant le stade prépupal. La larve prépupale commence, dès lors, à prendre l'apparence d'une abeille adulte (Winston, 1987).

Le stade pupal est le dernier stade, précédant le stade d'adulte formé ou imago. A ce stade, la tête, les yeux, les antennes, les pièces buccales, le thorax, les pattes et l'abdomen ont les caractéristiques de celles de l'adulte. La cuticule devient de plus en plus sombre. A l'intérieur de la pupa, les muscles et les organes se transforment (Winston, 1987).

Puis une dernière mue intervient. Après sa sortie, l'adulte déploie ses ailes et ses antennes, et laisse sécher ses poils avant de commencer ses activités.

A peine née, l'abeille est encore molle et il lui faudra 12 à 24 heures pour que sa cuticule extérieure sèche. Tant que l'exosquelette autour des glandes vulnérantes n'est pas durci, la jeune abeille ne peut piquer (Winston, 1987).



Figure 7 : Différentes étapes du développement d'*Apis mellifera*. Encyclopédie-universelle website.

Dans les 8 à 10 jours suivant la naissance, le développement interne (notamment des glandes) se poursuit, de même que le développement de leurs organes reproducteurs.

La plupart des abeilles des régions tempérées entre en diapause sous forme immature, généralement au stade prépupe. D'autres n'entrent en diapause que lorsqu'elles sont adultes (Wcislo & Cane, 1996). Mais ces mécanismes de diapause ne sont pas encore très bien documentés.

1.1.3. Spécialisation alimentaire

Les plantes à fleurs sont indispensables aux abeilles. Les larves et les imago se nourrissent de leur pollen et de leur nectar (Dötterl *et al.*, 2005). Un certain nombre de stratégies de butinages différentes peuvent être observées chez les abeilles. Certaines espèces visitent un nombre limité de plantes disponibles dans leur habitat (monolectisme, oligolectisme) tandis que d'autres butinent une plus large gamme de plantes hôtes (mésolectisme, polylectisme) (Cane & Sipes, 2006 ; Praz *et al.*, 2008b ; Dötterl & Vereecken, 2010). De nombreux auteurs ont proposé de classifier les stratégies élaborées par les Apoidea apiformes. La classification choisie ici est celle proposée par Müller & Kuhlmann (2008).

Table 1 : Catégories des gammes de plantes butinées par l'abeille d'après Müller & Kuhlmann (2008). s.l. = sensu lato, s.s. = sensu stricto

Catégories	Sous catégories	Définitions
Monolectisme	-	Récolte de pollen sur une seule espèce de plante même en présence d'une ou de plusieurs espèces sympatriques du même genre.
Oligolectisme	Oligolectisme strict	Récolte de pollen sur deux à plusieurs espèces appartenant à un genre de plante.
	Oligolectisme large	Récolte de pollen sur deux à plusieurs genres appartenant à une tribu, sous-famille ou famille de plante.
	Oligolectisme éclectique	Récolte de pollen sur deux à quatre genres appartenant à deux ou trois familles de plante.
Polylectisme s.l.	Polylectisme avec forte préférence	Récolte de pollen sur plusieurs familles de plantes, mais un clade de plante (famille, sous-famille, tribu, genre ou espèce) prédomine.
	Mésolectisme	Récolte de pollen sur plus de quatre genres de plantes appartenant à deux ou trois familles de plante.
	Polylectisme s.s.	Récolte de pollen sur différents genres appartenant au moins à quatre familles de plantes.

Les abeilles solitaires, qui ont un cycle de vie assez court, sont plus souvent oligolectiques que les abeilles sociales. Elles se sont spécialisées sur un petit nombre d'espèces végétales sur lesquelles elles retournent continuellement. Il y a quelques années, il était admis que l'oligolectisme était un caractère évolué à partir d'ancêtres polylectiques (Iwata, 1976). Mais récemment, Danforth *et al.* (2006) suggèrent que l'oligolectisme pourrait être l'état ancestral chez les apoïdes apiformes.

Il est indispensable que ces abeilles oligolectiques émergent au moment de la floraison de leur plante hôte. Cette synchronisation assure à l'abeille de trouver assez de nourriture jusqu'à la fin de ses activités (Michez *et al.*, 2008). Cette synchronisation des activités de butinage se fait aussi à l'échelle journalière (Eickwort & Ginsberg, 1980).

Il n'existe pas que des adaptations phénologiques, les femelles d'abeille présentent aussi de nombreuses adaptations structurelles et comportementales.

Par exemple, dans le cas du transport du pollen, certaines femelles ramènent le pollen jusqu'à leur nid en le stockant à l'intérieur de leur tube digestif (Thorp, 1979) mais la plupart possède des structures particulières externes pour accumuler un maximum de pollen dans leurs scopae.

Les abeilles oligolectiques qui récoltent du pollen difficile d'accès (Müller, 2006) ou de grande taille (Pasteels & Pasteels, 1979 ; Thorp, 1979) arborent soit des poils en crochet sur le proboscis ou sur les pattes antérieures lorsque les anthères sont dissimulées (Shinn, 1967 ; Thorp, 1979 ; Parker & Tepedino, 1982 ; Houston, 1990, 1991 ; Harder & Barrett, 1993 ; Müller, 1995, Thorp, 2000), soit une pilosité plus abondante sur certaines parties de leur corps, généralement sur la tête (Thorp, 2000).

L'adaptation des abeilles oligolectiques s'exprime aussi au niveau physiologique. En effet, plusieurs études montrent que les espèces spécialistes digèrent plus efficacement le pollen de leur plante hôte habituelle que celui d'autres plantes. Sur d'autres types de pollen, les larves présentent un retard de croissance voire même un échec du développement (Levin & Haydak, 1957 ; Guirguis & Brindley, 1974 ; Tasei & Masare, 1978 ; Praz *et al.*, 2008a).

1.2. Métabolisme stérolique

Les stérols sont des lipides insaponifiables à 27 atomes de carbone (Behmer & Nes, 2003). Ils sont caractérisés par 3 domaines : un groupement hydroxyle (-OH) sur le C3, une chaîne aliphatique latérale de 8 à 10 atomes de carbone au niveau du carbone 17 et un noyau de base tétracyclique appelé cyclopentanoperhydrophénantrène. Ce noyau est composé de 3 cycles à 6 carbones et d'un cycle à 5 carbones (A, B, C et D) (Fig. 8).

Contrairement aux vertébrés, les insectes sont incapables de synthétiser des stérols dont le cholestérol. Ces stérols sont pourtant indispensables. En effet, ils constituent les structures biolipidiques, sont les précurseurs d'importantes hormones stéroïdiennes telles que les ecdystéroïdes et jouent le rôle de molécule de signalisation se liant au groupe de protéines *Hedgehog*. Les insectes doivent donc acquérir les stérols par une source exogène, leur alimentation (Clarck & Bloch, 1959; Svoboda *et al.*, 1978).

Il existe une très grande diversité de métabolisme et de manière d'utiliser ces stérols dans le groupe des insectes. Cette diversité reflète certainement leurs différentes adaptations au cours de l'évolution (Svoboda & Lusby, 1994).

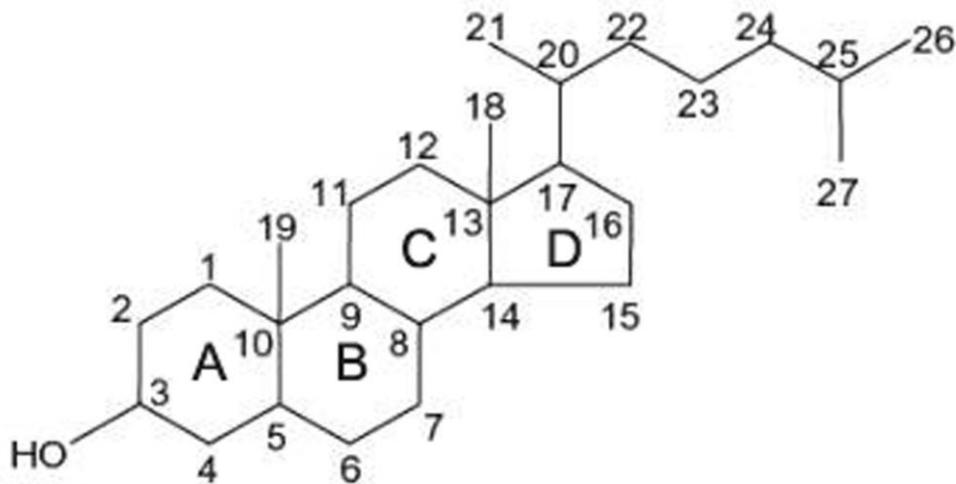


Figure 8 : Représentation générale des stérols (cyberlipid.org)

Le rôle des stérols dans l'alimentation des insectes est un sujet très étudié depuis plusieurs dizaines d'années. Le premier à avoir découvert leur importance est Hobson (1935) lors de ses travaux sur *Lucilia sericata* Meigen (Diptera : Calliphoridae). C'est la seule différence nutritionnelle remarquable et prouvée entre les insectes et la plupart des autres animaux. Il faut attendre les travaux de Clark et Bloch (1959) pour mettre en évidence l'incapacité des insectes à synthétiser des stérols. Depuis, Svoboda *et al.* (1995) ont étendu cette constatation à d'autres genres d'insectes (Orthoptère, Blattoptère, Hémiptère, Coléoptère, Diptère, Lépidoptère et Hyménoptère).

Un des stérols les plus importants est le cholestérol ($C_{27}H_{45}OH$) (Fig. 9). Son rôle est essentiel dans le contrôle de la croissance larvaire et le développement (Clark & Bloch, 1959). Il est un des précurseurs de l'hormone de mue. Les insectes dont l'alimentation est constituée de tissus animaux ou d'éléments provenant d'animaux, n'ont pas de problème pour se procurer le cholestérol. En effet, il y est présent en abondance.

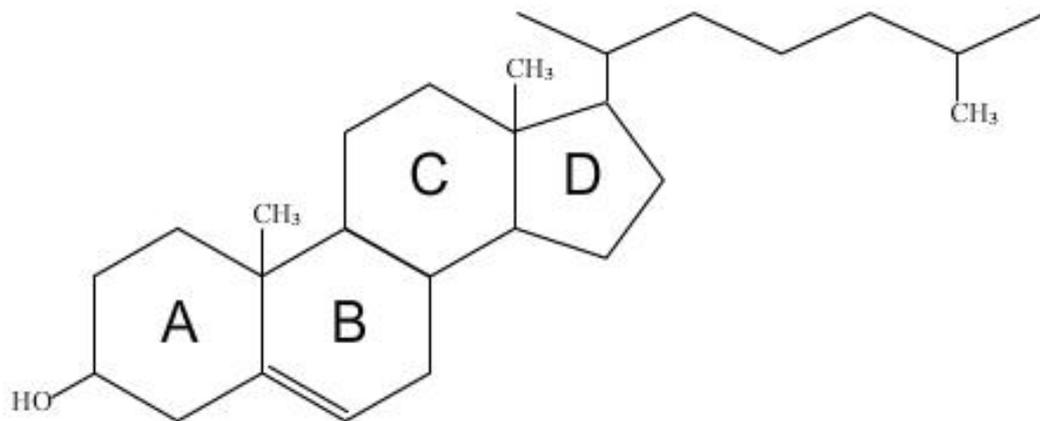


Figure 9 : Structure du cholestérol (Vie website, snv.jussieu.fr)

Un problème se pose pour les insectes phytophages dans l'acquisition des stérols. En effet, les plantes contiennent des phytostérols mais pas ou peu de cholestérol (Behmer & Elias, 1999). Les phytostérols sont des stérols constitués de 28 ou 29 atomes de carbone. Au moins 100 stérols différents ont été identifiés chez les plantes (Behmer & Nes, 2003).

Les nombreuses études réalisées afin d'établir les profils stéroliques des plantes montrent que les stérols les plus souvent retrouvés sont le β -sitostérol, le 24-méthylènecholestérol et le campestérol (Akihisa *et al* ,1991).

On retrouve aussi souvent dans les Angiospermes les Δ 5-stérols sitostérol et stigmastérol (Behmer & Nes, 2003). Certains phytostérols ne peuvent être métabolisés chez certains insectes, ainsi *Schistocerca americana* (Orthoptère :Acrididae) ne peut métaboliser les phytostérols qui contiennent une double liaison sur le C7 ou sur le C22 et ne peut donc pas bien se développer même si les stérols avec une double liaison en C5 sont présents en suffisance (Behmer, Elias & Bernays, 1999)

Les insectes ont développé 3 stratégies différentes pour pallier à ce manque de cholestérol. Certains phytophages peuvent profiter des micro-organismes intestinaux ou des symbiotes (Clayton 1964 ; Svoboda *et al.*, 1978).

D'autres obtiennent leur cholestérol par désalkylation de la chaîne latérale située au niveau du carbone 24 des C28 et C29 phytostérols (Svoboda & Feldlaufer, 1991). C'est le cas, par exemple, des thentrèdes (Hyménoptère : Symphyte) (Svoboda *et al.*, 1995). L'intermédiaire final dans la conversion des phytostérols C28 et C29 en cholestérol est le desmostérol (Svoboda & Robbins, 1968 ; Svoboda *et al.*, 1982).

Les insectes du troisième groupe sont incapables de faire cette désalkylation, ils utilisent alors un autre stérol comme précurseur d'hormone de mue. Ce dernier groupe se compose de 2 espèces de Coléoptère, quelques espèces d'Hémiptère et l'abeille mellifère chez les Hyménoptères (Svoboda *et al.*, 1986). Elles convertissent alors un C28 stérol, le campestérol, en makistéron A à la place des habituels ecdysone et 20-hydroxyecdysone (Fig.10) (Svoboda & Feldlaufer, 1991).

Selon Regali (1996), *Bombus terrestris* (L.) est capable de moduler la synthèse de ses hormones de mues en fonction de son alimentation. Par exemple, lorsque son alimentation est riche en cholestérol, les prépupes synthétisent du 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone (ecdystéroïdes à 27C). Mais avec une alimentation contenant plus de β -sitostérol, les hormones préférentiellement synthétisées seront alors la makistéron A et la 20-désoxymakistéron A.

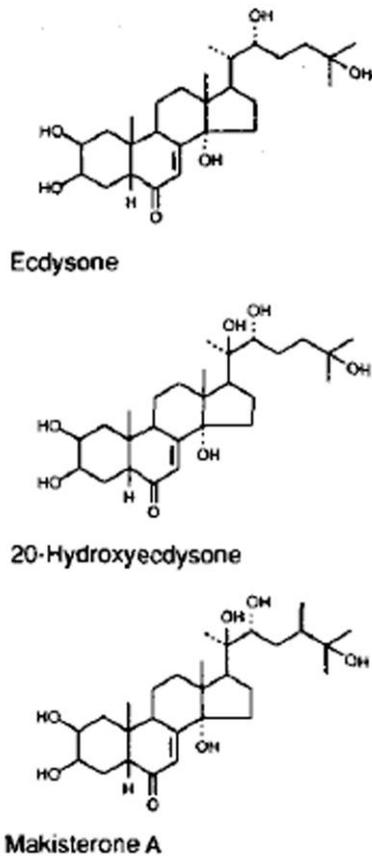


Figure 10 : Structure des ecdystéroïdes (Svoboda & Feldlauer, 1991)

Le stérol prédominant dans les ovaires de la reine d'*Apis mellifera* est le 24-méthylènecholestérol (Feldlauer *et al.*, 1986). Il représente plus de 53% de tous les stérols présents, suivi du β -sitostérol (19%) et de l'isofucostérol (14,3%) (Feldlauer *et al.*, 1986). Les stérols C27, eux, ne représentent que 2% des stérols. Le 24-méthylènecholestérol est également le stérol dominant chez les ouvrières et les prépupes d'*Apis mellifera* (Feldlauer *et al.*, 1986). L'abeille est capable de faire un transfert sélectif de certains stérols aux larves en développement à travers la nourriture du couvain (Svoboda *et al.*, 1986). Les insectes ont besoin de stérols à structures spécifiques, tous les stérols ne seront donc pas utilisés (Robbins *et al.*, 1971). Chez la sauterelle, seul le cholestérol et le β -sitostérol permettent un développement complet de l'individu (Behmer & Elias, 1999). Ils peuvent stocker des stérols pour les utiliser et les incorporer en temps voulu, par exemple dans les tissus du système reproducteur lors de la maturation ou de la production d'œufs.

1.3. Métabolisme stéroïdique

Les ecdystéroïdes dérivent du cholestérol et ont un rôle hormonal majeur. Ce sont des stéroïdes polyhydroxylés présents chez de nombreuses plantes, chez certains nématodes, chez tous les insectes et chez les autres arthropodes (Li *et al.*, 2006). Ils sont essentiels à chaque mue et à chaque changement morphologique qu'un insecte subit (Svoboda & Feldlaufer, 1991). En effet, ils régulent la mue, la métamorphose, la reproduction mais aussi l'oogenèse (Bloch *et al.*, 2000).

Il existe des analogues aux ecdystéroïdes chez les plantes, les phytoecdystéroïdes, apportant certainement une protection aux plantes contre les insectes phytophages non-adaptés (Dinan, 2001).

Les deux ecdystéroïdes les plus communs chez les insectes sont l'ecdysone et le 20-hydroxyecdysone. Ce sont des stéroïdes constitués de 27 carbones dérivés du cholestérol (Svoboda & Feldlaufer, 1991).

Au moins 9 étapes sont nécessaires à cette transformation mais le processus n'est pas encore complètement compris (Li *et al.*, 2006). Elle commence par une réduction en 7 β et 8 β du cholestérol grâce à une 7,8-déshydrogénase non identifiée présente dans la glande prothoracique. Le 7-déshydrocholestérol ainsi obtenu serait, semble-t-il, converti en 2,22,25-tridésoxyecdysone mais cela reste une hypothèse. Une autre hypothèse est qu'il soit emmené dans une mitochondrie où il serait oxydé. C'est cette étape qui constitue la boîte noire de la cascade métabolique (Fig.11). Dans tous les cas, il y aura production de 2,22,25-tridésoxyecdysone (Kétodiol). Arrive ensuite une série d'hydroxylation menant au 2,22-didésoxyecdysone (Kétotriol) puis au 2-désoxyecdysone, pour terminer par l'ecdysone et le 20-hydroxyecdysone (Gilbert *et al.*, 2002).

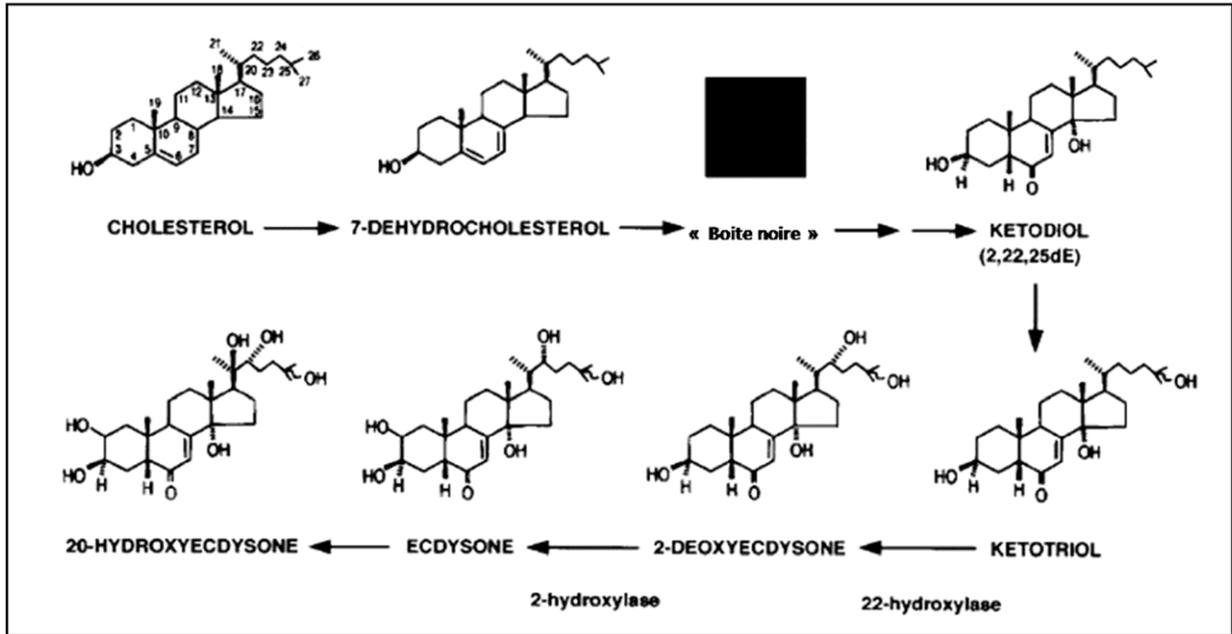


Figure 11 : Cascade métabolique menant au 20-Hydroxyecdysone (d'après Thummel & Chory, 2002).

L'ecdysone est sécrétée par les glandes prothoraciques au cours de la vie larvaire et nymphale sous le contrôle d'une « hormone d'activation », elle-même sécrétée par les cellules neuro-sécrétrices du centre cérébral. Certaines études semblent montrer que le cholestérol serait lui-même cette « hormone d'activation » (Clayton, 1964).

La makistéron A est un ecdystéroïde C28 et le stéroïde majeur trouvé chez la puppe et dans les ovaires d'*Apis mellifera* (Feldlaufer *et al.*, 1986 ; Svoboda & Feldlaufer, 1991).

1.4. Appareil reproducteur femelle

Les femelles possèdent deux ovaires d'aspect filamenteux, placés de chaque côté de l'intestin. Ils s'étirent dans l'abdomen depuis la hauteur du jabot jusqu'au sixième ganglion abdominal (Chauvin, 1968).

Chacun de ces ovaires est formé par la réunion d'un grand nombre de tubules, les ovarioles (Martins & Serraõ, 2004). Celles-ci se regroupent à l'intérieur d'une gaine permanente ou transitoire. Toutes leurs extrémités sont reliées par deux ligaments supérieurs communs fixés à la paroi antérieure de l'abdomen, appelés ligaments suspenseurs de l'ovaire (Grassé, 1977).

Tous les tubes ovariques d'un même côté se terminent en un calice ovarien pour former un oviducte cylindrique peu allongé qui rejoint celui du côté opposé. Ils forment ainsi un vagin cylindrique, large et court. Ses parois sont pourvues de fibres musculaires et parsemées de cellules agglomérées sécrétant un liquide visqueux. Ce liquide pourrait servir à fixer chaque œuf au fond de la cellule dans laquelle il doit être déposé.

Dans le vagin s'ouvre, par l'intermédiaire d'un petit tube appelé conduit séminal, une poche arrondie (spermathèque), dans laquelle s'accumulent les spermatozoïdes après la copulation.

Le nombre d'ovarioles constituant les ovaires d'un Hyménoptère adulte est très variable : 4 ovarioles par ovaire chez les Allodapines (Hymenoptera, Xylocopinae) mais 10 ovarioles par ovaire pour *Stizoide reninctus* (Hymenoptera, Crabonidae) (O'neil & Pearce, 2007). D'après Kugler *et al.* (1976), chez les vespidae le nombre de 12 ovarioles peut être atteint. Selon Rozen (2003), le nombre d'ovarioles plésiomorphiques chez les Apoidea est de 3-4 ovarioles par ovaire. Selon Winston (1987), dans un certain nombre de cas, les ovaires gauche et droit peuvent posséder un nombre d'ovarioles différent.

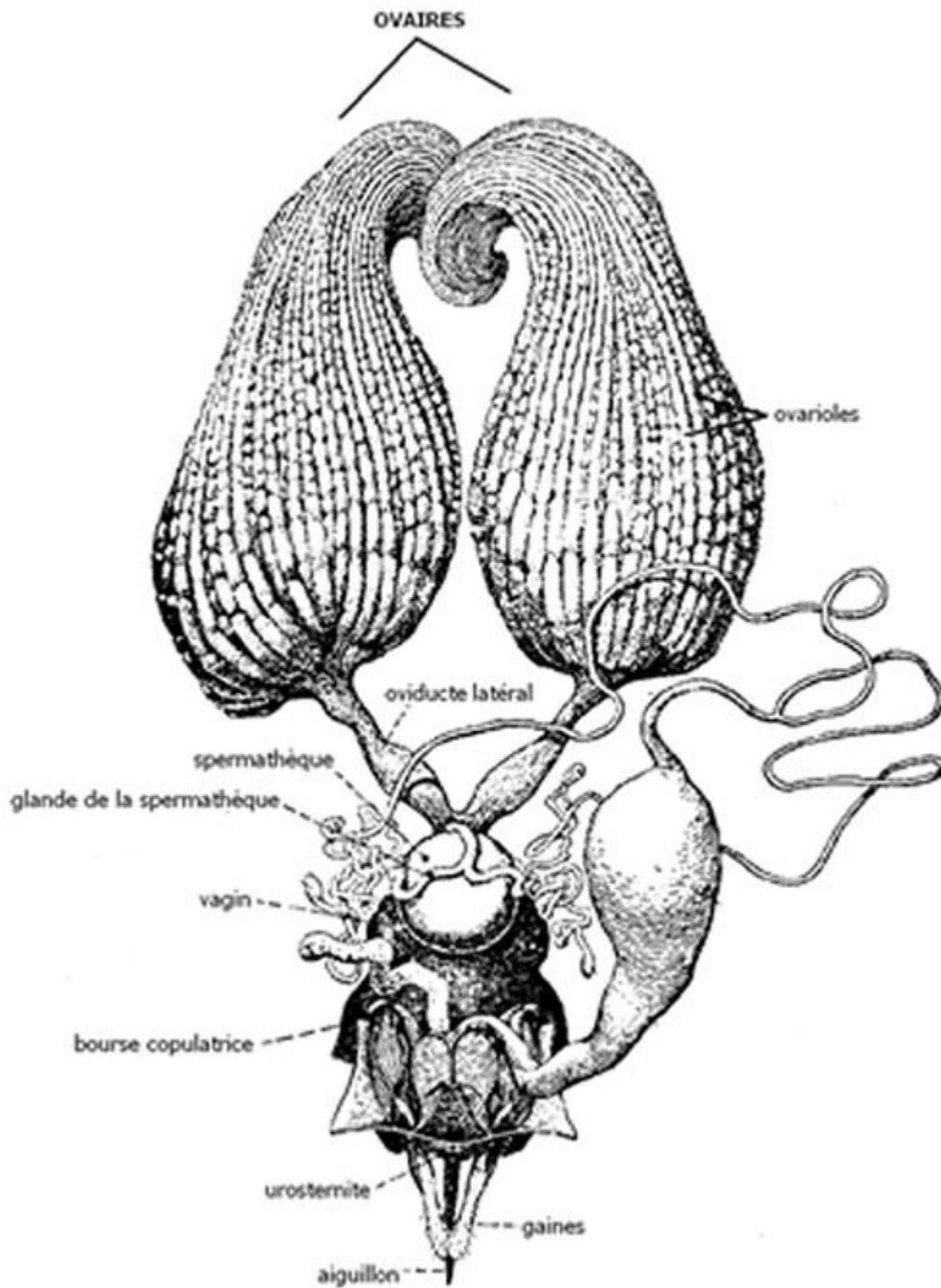


Figure 12. Le système reproducteur et vulnérant d'une reine fécondée (redessiné de Dade 1977 et Snodgrass1956) (Winston, 1987).

1.5. Oogenèse

Chaque ordre d'insectes est caractérisé par un type déterminé d'ovarioles. Les ovaries des abeilles sont de type méroïstique polytrophique (Grassé, 1977 ; Gilbert, 2004 ; Martins & Serrão, 2004). Ce qui signifie que la multiplication des oogonies donne naissance à des clones de cellules. Les oogonies sont les cellules germinales femelles immatures qui peuvent se diviser par mitose.

Une seule de ces cellules évolue en oocyte, les autres deviendront des trophocytes. Tous ces trophocytes seront inclus dans les follicules du vitellarium en même temps que l'oocyte (Grassé, 1977). Les cellules issues de l'oogonie restent attachées les unes aux autres par des ponts cytoplasmiques (Gutzeit *et al.*, 1993 ; Gilbert, 2004). Dans chaque ovariole, on peut suivre les étapes de l'oogenèse en observant les différentes formations de l'apex à la base (Gutzeit *et al.*, 1993).

Une ovariole comprend 4 segments inégaux : le filament terminal, le germinarium, le vitellarium et le pédicelle (Grassé, 1977).

La lumière étroite du filament est remplie de cellules alignées et comprimées dans une direction antéropostérieure. Ces cellules sont considérées comme des oogonies mais il est impossible de savoir avec certitude s'il s'agit des lignées germinales ou folliculaires. Elles sont donc appelées cellules souches (Gutzeit *et al.*, 1993).

Le germinarium, à la lumière plus élargie, est séparé du filament par un mince septum. Il contient les cellules germinales, les oocytes, et cellules somatiques, les préfolliculeuses. Dans la région basale du germinarium, ces cellules s'organisent en follicules.

Le vitellarium est souvent très long. Les follicules y sont alignés et séparés les uns des autres par des pédoncules interfolliculaires ou par de simples amas de cellules interfolliculaires. C'est au niveau du vitellarium que se déroule l'accroissement de la cellule germinale, la vitellogenèse et la formation des enveloppes de l'oocyte.

Le pédicelle rattache le vitellarium à l'oviducte.

Les cellules souches, localisées dans la partie apicale du germinarium, donnent naissance à deux types de cellules : une cellule souche qui peut continuer à se diviser par mitose et un cystoblaste. Cette dernière cellule forme une population de cellules dont le futur oocyte et les cellules trophiques.

Dans la partie distale du germinarium, la population de cellules préfolliculeuses se divisent pour entourer le follicule formé par l'oocyte et ces trophocytes. Elles isolent ainsi les follicules les uns des autres. Le nombre de follicules varie selon l'espèce.

Chez *Apis mellifera*, l'ovulation peut avoir lieu toutes les 3 à 5h dans chacune des 150 à 180 ovarioles de l'ovaire (Gutzeit et al., 1993). Ce haut taux de ponte peut être maintenu pendant plusieurs saisons. Une reine d'abeille peut donc produire au total plus de 500.000 œufs (Gutzeit et al., 1993). Il existe un rapport étroit entre l'alimentation et la reproduction chez *A. mellifera*, ce qui explique pourquoi le développement des ovaires est plus bas au printemps, plus grand en été et intermédiaire en automne (Hoover et al., 2006 ; Human et al., 2007). Les régimes riches en protéine favorisent le développement des ovaires et des œufs (Human et al., 2007).

Un autre facteur influençant le nombre d'œufs pondus est le mode de vie (Iwata & Sakagami, 1966).

Sakagami et Akahira (1958) classent les ovaires en 3 classes : classe I, les ovaires sont rudimentaires ; classe II, les ovaires commencent à enfler mais on ne distingue pas encore les œufs et classe III, les œufs peuvent être distingués.

Hess (1942 cité par Velthuis 1970) distingue 5 stades de développement de l'ovaire d'*Apis mellifera*: stade 1, pas de distinction entre œufs et cellules nourricières ; stade 2, l'ovaire reste mince et allongé mais quelques différences deviennent discernables ; stade 3, un seul œuf atteint la taille d'un œuf mûr et stade 4 – 5, plus d'un œuf a la taille d'un œuf mûr, le contour de l'œuf montre aussi des gonflements et des constriction.

Velthuis (1970) divise le cycle ovarien en 8 stades.

Au premier stade, les ovaires sont complètement au repos, les ovarioles sont petites et très proches les unes des autres (Fig. 13 A). Au stade suivant, l'ovogenèse commence dans le haut de l'ovariole. Les cellules élargissent l'ovariole en descendant (Fig. 13 B).

Sur l'image C (Fig. 13), la plupart des œufs plus âgés sont maintenant entourés d'un épithélium. Les œufs et les trophocytes sont facilement distinguables.

Ensuite, les trophocytes peuvent être distingués dans les follicules nutritifs.

Autour des œufs, l'épithélium est plus grand qu'autour des trophocytes (Fig. 13 D). Au stade 5, les œufs dépassent le follicule nutritif en volume (Fig. 14 E). Les cellules folliculaires autour des œufs deviennent de plus en plus différentes des cellules plates qui entourent les trophocytes. L'extension des œufs dans le follicule nutritif peut être clairement observée au fur et à mesure (Fig. 14 F).

Les œufs les plus avancés ont seulement un petit reste de trophocytes derrière eux. L'œuf supérieur est plus avancé que ceux plus bas (le matériel sombre a déjà disparu) (Fig. 14 G).

Lorsque l'œuf mature glisse de l'oviducte, le chorion se sépare de l'œuf à cause de la pression (Fig.14 H).

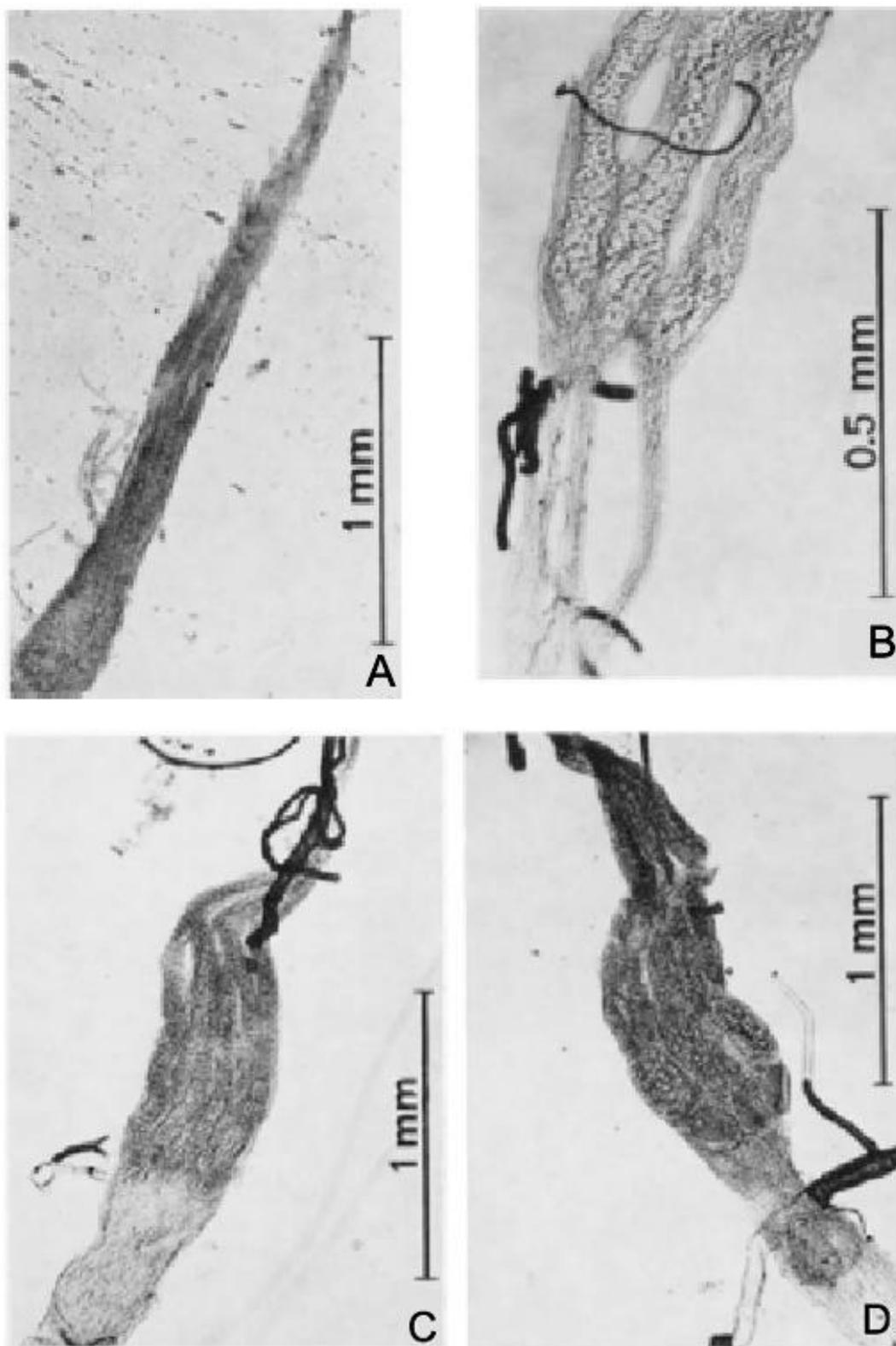


Figure 13 : Classement des stades de maturation ovarienne selon Velthuis (1970) ; part I (de A à D)

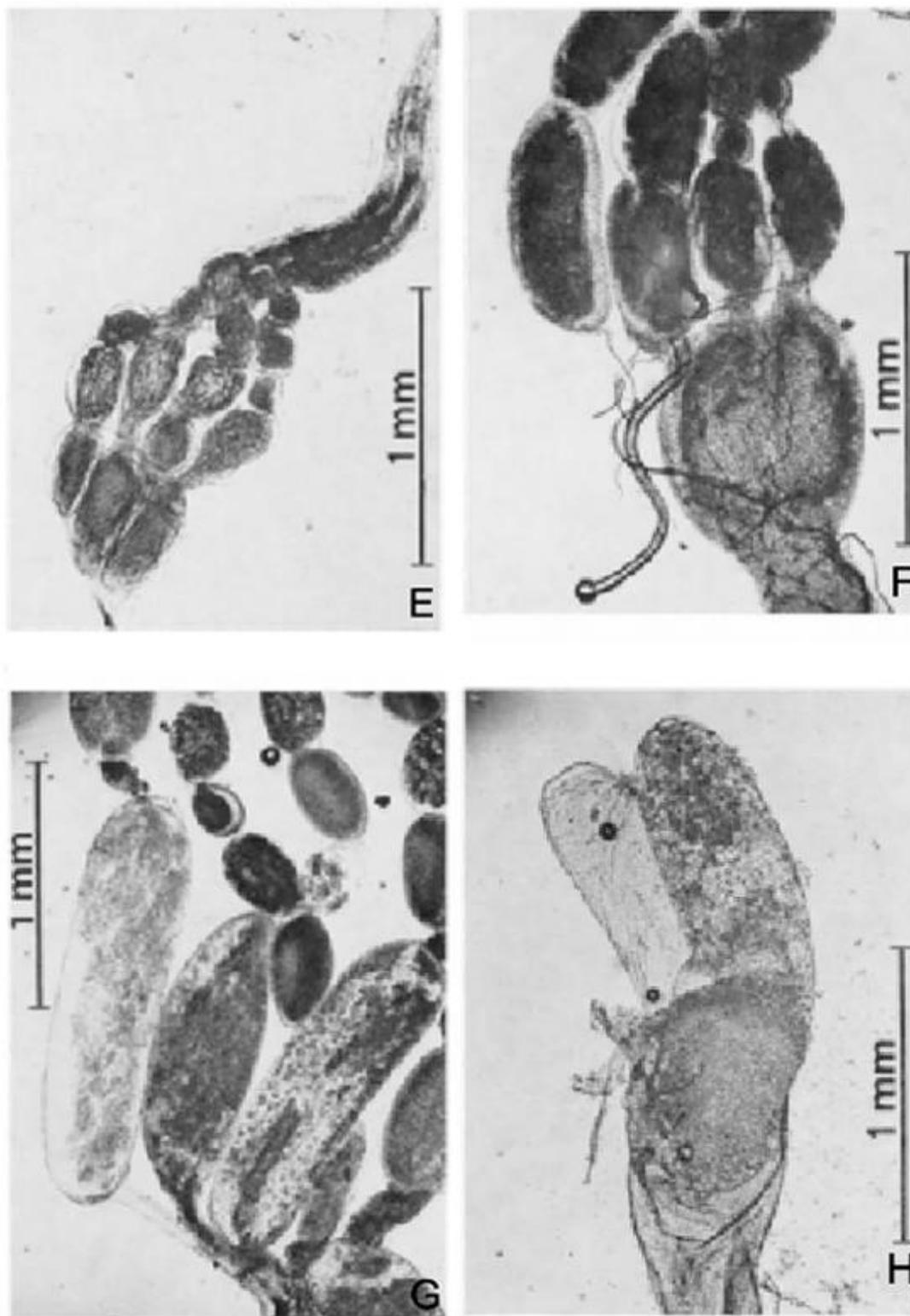


Figure 14 : Classement des stades de maturation ovarienne selon Velthuis (1970) ; part II (de E à H).

1.6 Objectif

La spécialisation alimentaire a souvent été étudiée comme une contrainte pour le développement des larves (Praz *et al.*, 2008a ; Sedivy *et al.*, 2011). Mais aucune étude n'a abordé la question de la contrainte de développement chez les imagos.

Une étude récente a montré qu'il existait une variabilité intraspécifique dans les profils stéroliques des femelles d'*Andrena vaga* (Vanderplanck, 2009). Cette variabilité pourrait être due aux différents stades de maturation des ovaires influant sur le métabolisme stérolique et les taux des différents composés. Dans le cas d'*Andrena vaga*, il semblerait que la spécialisation alimentaire ait entraîné une physiologie particulière des stérols chez l'adulte.

L'objectif de ce travail est de déterminer s'il existe, chez cette espèce, une relation entre le degré de maturation des ovaires et les concentrations stéroliques tissulaires.

Le second objectif est de déterminer quel ecdystéroïde utilise *Andrena vaga*, notamment pour la maturation de ses ovarioles et de le comparer à deux espèces généralistes : *Apis mellifera* – modèle très étudié et donc bien renseigné- et *Colletes cunicularius* – espèce syntopique partageant les exigences écologiques d'*Andrena vaga*.

1.7 Modèle biologique

Andrena vaga (Panzer) est une espèce d'abeille faisant partie du genre *Andrena*, le plus important de la famille des Andrenidae. Ce genre compte environ 200 espèces en Europe (Bellmann, 1999).

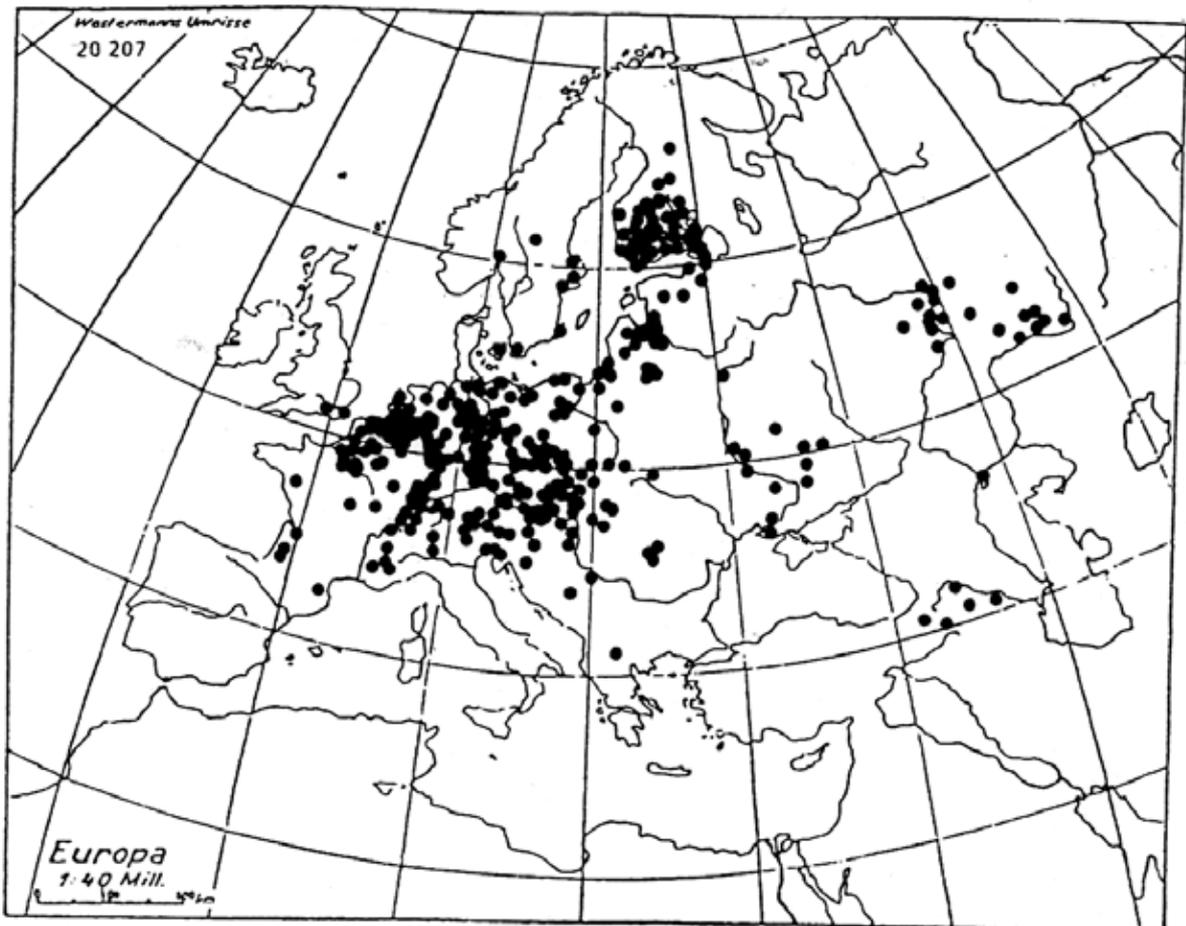


Figure 15 : Carte de distribution d'*Andrena vaga* (Panzer), d'après Gusenleitner & Schwarz, 2002.

Largement répandues à travers toute la région Paléarctique, ces abeilles nidifient dans les terrains sablonneux, souvent légèrement en pente et bien exposés au soleil (Bischoff *et al.*, 2003 ; Exeler *et al.*, 2008).

L'andrène vague creuse un nid dans le sol comprenant une galerie principale verticale de 15 à 40 cm se ramifiant en plusieurs galeries latérales. Chacune de ces galeries se termine par une loge sphérique (Pouvreau, 2004) (Fig. 16).

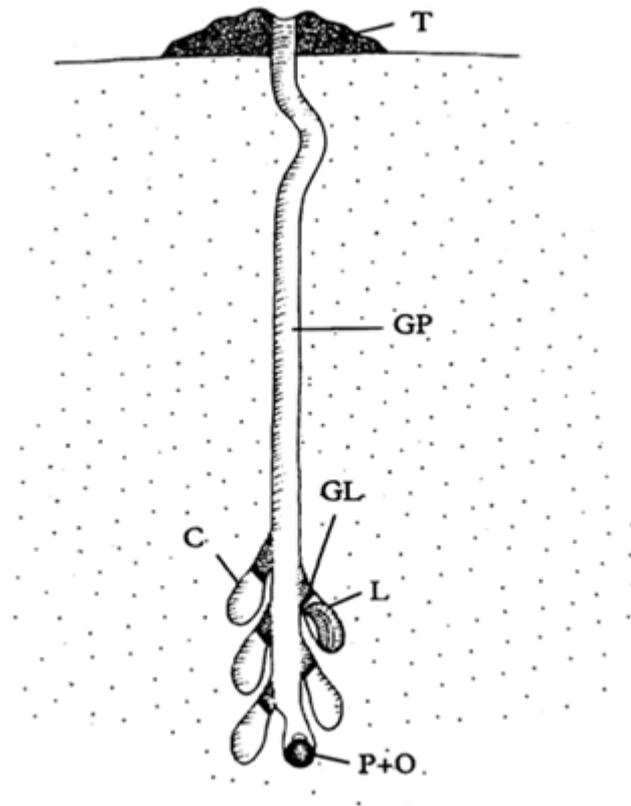


Figure 16 : Nid d'*Andrena vaga*. C: cellule; GL: galerie latérale; GP: galerie principale ; L: larve; P+O: pain de pollen avec un œuf ; T: tumulus Pouvreau, 2004 ; modifié par Vanderplanck, 2009)

Ces abeilles sont noires avec des poils gris pâles sur le thorax (Fig.17).



Figure 17 : Photo *Andrena vaga*, (Atlas Hymenoptera. Y. Barbier).

Cette espèce est dite précoce en raison de sa période de vol s'étalant de mars à mai. Elle émerge au début du printemps avec les premières journées ensoleillées. L'andrène vague est une espèce protandre dont les mâles plus petits sortent deux semaines avant les femelles, ils volent en nuées au-dessus des nids. Les femelles, nettement plus grandes, émergent début avril en Belgique (Vanderplanck *et al.*, 2009).

Spécialiste des fleurs de saule (*Salix sp.*), l'andrène vague récolte du pollen sur ses pattes postérieures et stocke du nectar dans son jabot (Bischoff *et al.*, 2003 ; Exeler *et al.*, 2008 ; Vanderplanck *et al.*, 2009). C'est une espèce strictement oligolectique. La présence de grosses brosses de récolte sur les pattes postérieures permet à la femelle d'accumuler d'importantes quantités de pollen. Les rythmes d'activité et d'approvisionnement en pollen et en nectar dépendent de la taille des scopae et de la pilosité corporelle (Bischoff *et al.*, 2003).

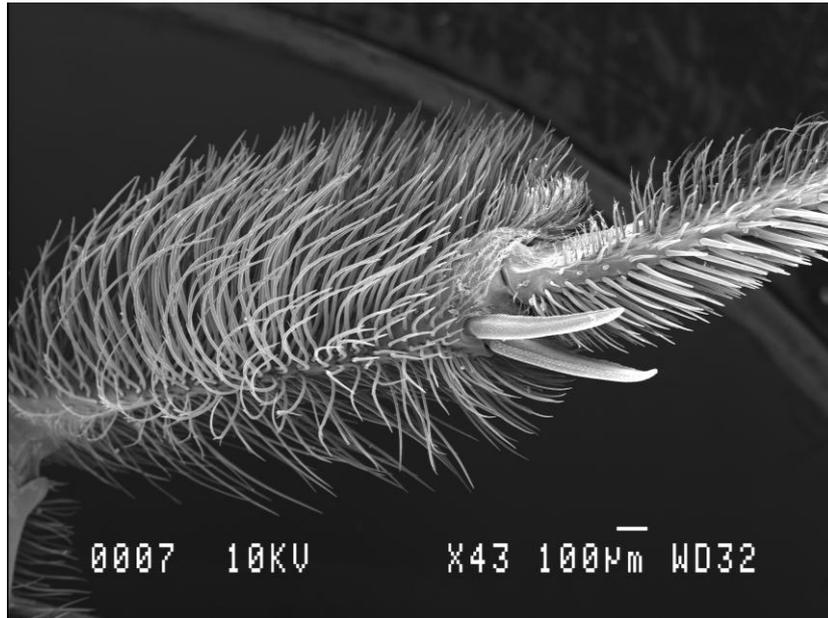


Figure 18 : Tibia postérieur d'*Andrena* sp. (Photo au SEM, G. Carreaux)

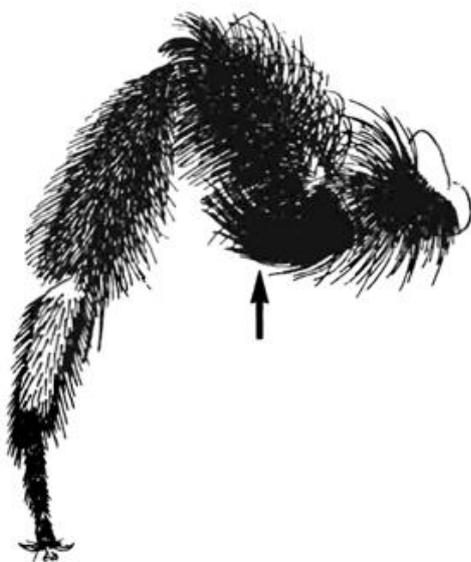


Figure 19 : Patte postérieure d'andène possédant des poils très denses et une brosse de poils sur sa base (flèche) (Bellmann,1999).

Le pollen récolté par les femelles est ensuite mélangé à du nectar pour former une pâte nourricière qu'elles accumuleront dans les loges larvaires. La femelle pond ensuite un œuf à la surface du pain de pollen et referme la cellule avec un bouchon de sable (Fig. 20) (Pouvreau, 2004).

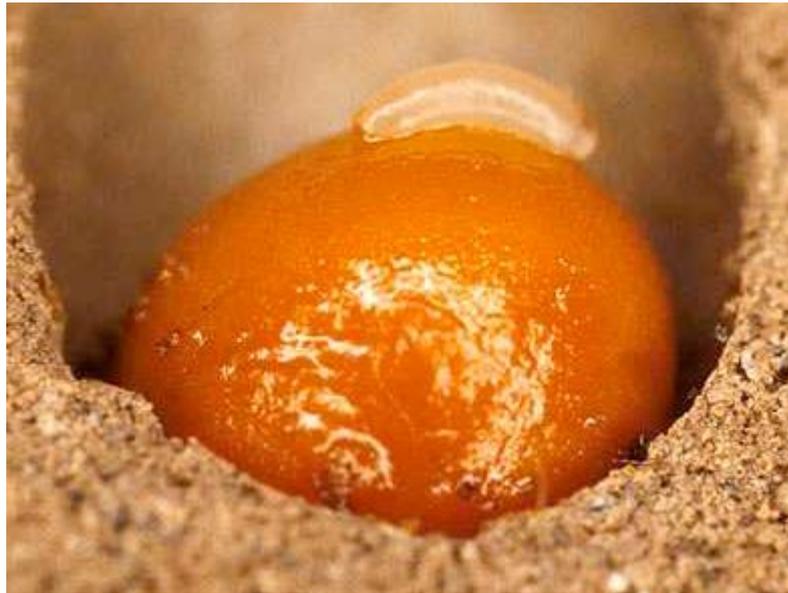


Figure 20: Détail d'une cellule larvaire d'*Andrena vaga* (Photos NJ Vereecken).

Elle commence alors la construction d'une nouvelle cellule qu'elle approvisionnera de la même façon. Les nids d'*Andrena vaga* sont difficiles à repérer car la femelle obture l'entrée du nid entre deux approvisionnements. Cela limite l'action des cleptoparasites (Abeille coucou *Nomada lathburiana* (Hymenoptera, Apidae)).

Andrena vaga collecte le pollen et le nectar des jours différents, ce qui donne lieu à des patterns de vol différents. La plupart des vols d'*Andrena vaga* durent entre 1 et 2,5 heures les jours de collecte de pollen et entre 2 et 3,5 heures les jours de collecte de nectar (Bischoff *et al.*, 2003).

Cette espèce univoltine (Bischoff *et al.*, 2003) cesse ses activités vers avril-mai et meure avant que sa progéniture ne devienne adulte. A la même période, les larves se développent rapidement puis restent quelques temps en diapause. La nymphose a lieu en été, suivie de la mue. Les imagos passent alors tout l'hiver dans leurs cellules. Ils n'émergent qu'au printemps suivant et perpétuent, instinctivement, les mêmes comportements que leurs parents.

Au cours de ces dernières années, l'habitat naturel d'*Andrena vaga* a souvent été dégradé par les canalisations des rivières, le drainage des terrains humides et la culture de prairies sèches ce qui a provoqué la diminution de la disponibilité en saule et en lieu de nidification (Exeler *et al.*, 2008).

Les nids d'*Andrena vaga* peuvent former des agrégations de 100 à plus de 5.000 nids (Exeler *et al.*, 2008). A Berlin, une telle agrégation de nids d'*Andrena vaga* a existé pendant 58 ans (Fellendorf *et al.*, 2004).

2. Matériel et méthode

2.1 Echantillonnage

2.1.1. Grande Bruyère de Blaton

Les échantillons ont été collectés sur les abords du site de la Grande Bruyère de Blaton. Ce site a été, au cours des années, très altéré par le dépôt clandestin de déchet mais aussi par la fréquentation des engins tout-terrain (Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website).

Ce site, constitué de 3 anciennes sablières, comprend notamment des étendues de sables non fixés, des lambeaux de lande à callune envahis par des genêts à balais et des bouleaux, des zones densément envahies de saules, quelques petits massifs boisés et une zone humide (Barone, 1999). Il représente un grand intérêt entomologique par la présence d'une très grande diversité hyménoptérologique dont plusieurs espèces menacées telles qu'*Andrena fuscipes* (Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website).

Les échantillons ont été collectés au cours des mois de mars, d'avril et de mai 2010. La station a été établie aux abords d'une route (Belgique, Hainaut, Blaton, WGS84 50°29'26,7'' N 03°40'55,9'' E).



Figure 21: Localisation de la station (google earth)

2.1.2 Collecte des femelles

Les femelles d'*Andrena vaga* ont été collectées à deux stades différents de leur cycle. Les premières ont été collectées le 17 mars 2010 alors qu'elles n'avaient pas encore émergé du sol. Celles-ci sont facilement découvertes en creusant dans le sol à un endroit repéré les années précédentes alors que les femelles creusaient leurs nids. Les autres, émergées, étaient en pleine période d'activité. Les collectes de ces dernières se sont faites en cours d'après-midi à plusieurs reprises les 9, 12, 13, 17 et 23 avril et le 5 mai 2010. Cette espèce est facile à capturer à même le sol lorsqu'elle retourne approvisionner son nid.

Toutes les femelles collectées sont isolées dans des tubes Eppendorfs numérotés. Le numéro reprend la station et l'identifiant de l'individu. Ces tubes ont été conservés à -40°C.

93 femelles ont été collectées au total : 26 individus non-émergés et 67 individus émergés. Tous les individus collectés sont repris en détails dans l'annexe.

2.1.3 Collecte de pollen

Afin de vérifier et de comparer la ressource alimentaire utilisée par *Andrena vaga* avec les données reprises dans la littérature, le pollen scopal porté par ces femelles a été déterminé par observation au microscope. Pour cela, une petite quantité de pollen scopal est frottée avec environ 1mm³ de gélatine. Cette gélatine est ensuite posée sur une lame au-dessus d'une petite flamme. La chaleur provoque la fonte de la gélatine et donc l'étalement des grains de pollen sur la lame. La gélatine est ensuite recouverte d'une lamelle pour permettre l'observation au microscope (Kleijn & Raemakers, 2008). Le pollen sera identifié sur base de l'ouvrage de Moore *et al.* (1978).

Par ailleurs, pour analyser la composition chimique des pollens collectés en 2010, nous avons prélevé le pollen scopal de plusieurs femelles. Les femelles sont maintenues à l'aide d'une pince au-dessus d'un tube Eppendorf. Avec un crochet, le pollen épars est récolté sur les pattes postérieures. Après avoir été pesé, le pollen est lyophilisé et pesé une dernière fois. L'échantillon est conservé à -40°C dans un tube Eppendorf.

Au total, 90 mg de pollen frais ont pu être récoltés.

Après lyophilisation, le poids de pollen total à disposition pour les analyses est de 82 mg.

2.2 Histologie

2.2.1 Préparation des échantillons

Les mesures de la distance intertegulae ainsi que de la longueur de la cellule radiale ont été prises afin d'estimer la taille de l'individu (Smith *et al.*, 2010).

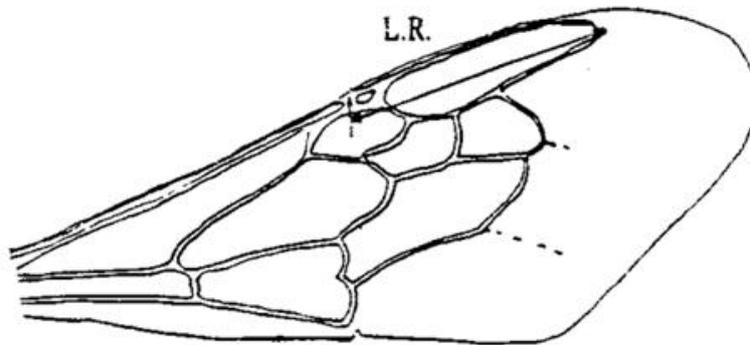


Figure 22: dessin d'une aile.

Les femelles destinées à illustrer l'histologie ovarienne ont été disséquées en présence d'eau distillée. Chaque paire d'ovaires a été photographiée et ensuite a été conservée dans un liquide fixateur, le liquide de Bouin, constitué d'acide picrique 1,1g, d'acide acétique 5 ml, de formaldéhyde 35 ml et d'eau distillée qsp 100 ml. Cette solution permet une bonne fixation des tissus.

2.2.2 Préparation des coupes

Les échantillons sont d'abord plongés pendant 1h dans un bain d'alcool 70% puis dans un 2^{ème} également pendant 1h, pour terminer par deux bains d'alcool 90% pendant 1h. Les échantillons sont ensuite lavés au butanol d'abord pendant 1h et ensuite pendant 12h mais cette fois en plaçant les échantillons dans une étuve à 60°C.

Enfin, les échantillons sont enrobés avec de la paraffine liquide à 60°C d'abord pendant 4h et puis pendant 12h avant de verser le tout dans des moules métalliques prévus à cet effet.

Ces échantillons emprisonnés dans la paraffine sont coupés à l'aide d'un microtome en sections de 7µm d'épaisseur puis colorés au trichrome de Masson et déposés sur lame.

Ces colorants utilisés sont solubles dans l'eau. Il faut donc déparaffiner les échantillons au toluène (deux passages de 5 min) pour les réhydrater ensuite. Les échantillons sont plongés dans un bain d'alcool 100% 5 minutes puis trempés dans un bain d'alcool 90% pour terminer par deux bains d'alcool 70% pendant 5 minutes. Les échantillons sont rincés sous un filet d'eau courante durant 15 minutes.

Pour colorer les échantillons, les lames sont plongées dans différents bains de colorants successifs (Gabe, 1968) :

- Hématoxyline de Groat pendant 3 minutes pour colorer les noyaux
- Passage de 15 minutes dans l'eau courante pour intensifier la coloration nucléaire
- Fuschine-Ponceau pendant 5 minutes pour colorer le cytoplasme
- Passage dans de l'acide acétique 1% pour rincer
- Orange G molybdique pendant 5 minutes pour donner de la brillance aux composés acidophiles
- Passage dans de l'acide acétique 1% pour rincer
- Vert lumière acétique pendant 5 minutes pour colorer le tissu conjonctif
- Passage dans de l'acide acétique 1% pour rincer

Les échantillons sont ensuite de nouveau déshydratés pour le montage via des passages dans de l'alcool 90% et 100% et éclaircis par des passages dans 2 bains de toluène.

Les lamelles sont montées sur les lames avec de la résine synthétique.

2.3 Analyses stéroliques micro-quantitatives

2.3.1 Préparation des échantillons

Afin d'évaluer le stade de développement de leurs ovaires, les femelles d'*Andrena vaga* nécessitent une préparation particulière avant leur analyse.

Après avoir été débarrassé de ses ailes et de ses pattes, chaque individu est disséqué dans une boîte de pétri dans un volume de 15ml de méthanol (qualité pour analyse).

Les ovaires ont été prélevés pour être photographiés au binoculaire couplé à un appareil photo. Après la prise de photo, toute l'abeille disséquée (corps et ovaires) ainsi que le milieu méthanolique sont récupérés dans un tube afin d'être analysés au laboratoire de chimie analytique du professeur Lognay à la faculté universitaire de Gembloux.

Pour les analyses de pollen, Vanderplanck *et al.* (2011) ont montré que 20 mg minimum sont nécessaires. Le pollen sera donc scindé en 3 échantillons.

2.3.2 Analyse des échantillons

La composition stérolique tissulaire des femelles d'*Andrena vaga* a été déterminée à la FUSAGx dans le service de chimie analytique du professeur Lognay. La méthode utilisée a été mise au point par Vanderplanck *et al.* (2011).

19 femelles non émergées ont été analysées individuellement ainsi que 20 femelles émergées (voir annexe). Trois échantillons de pollen scopal ont aussi été analysés.

Les échantillons contenus dans les 15 ml de méthanol PA sont séchés à l'aide d'un rotavapor puis remis en solution avec 1ml de KOH méthanolique.

L'analyse commence par une saponification avec 1,5 ml de KOH méthanolique (3,33 M) afin de séparer les fractions saponifiables et insaponifiables. C'est dans cette dernière fraction que l'on retrouve les stérols. Après cette réaction, une concentration connue de bétuline est ajoutée au mélange. Cette concentration connue permettra d'estimer la concentration des autres composés. Les stérols sont extraits de la fraction insaponifiable à l'aide d'éther diéthylique et ensuite rincés plusieurs fois à l'aide d'eau milli-Q.

Les stérols sont ensuite séparés des autres constituants de la fraction, par chromatographie sur couche mince. L'éluant utilisé est un mélange de chloroforme, d'éther diéthylique et d'ammoniaque (90 :10 :0,5).

Les stérols récupérés seront ensuite silylé à 90° avec de la pyridine anhydre et un réactif de silylation (SILYL-991). Cette étape est préférable pour des analyses en phase gazeuse car elle stabilise les molécules (Lognay *et al.*, 1989 ; Lognay *et al.*, 1992). La silylation utilisée ici consiste en la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement triméthylsilyl (TMS).

Les échantillons sont analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Conditions d'analyse :

Colonne	VF-5ms (30 m, 0.25 mm ID, df = 0.25µm)
Injecteur	“On-column” AS-2000 (ThermoFinnigan)
Température	60°C (1min) jusque 290°C (30°C/min) suivi d'un isotherme à 290°C (22 min) et d'une pointe thermique jusque 325°C (30°C/min) Durant 5 min
Gaz vecteur	Helium 90KPa
Appareil	GC-8000 Top series (ThermoQuest)

Les différents composés ont été identifiés sur base des temps de rétention relatifs en CPG. Ces identifications ont été préalablement effectuées en GC-MS lors d'une étude précédente (Vanderplanck, 2009).

Les chromatogrammes sont analysés ensuite avec le programme ChromCard.

Le résultat du GC sous forme de chromatogramme a été recalculé avec différentes formules :

- Formule utilisée pour calculer le taux en mg de stéroïdes.

$$\{(Aire\ du\ pic\ x / aire\ du\ pic\ de\ bétuline) \times (concentration\ en\ ISTD\ (mg/ml))\} \times 1000$$

Sachant que l'ISTD vaut 0,052 mg/ml

- Formule utilisée pour calculer le pourcentage de chaque stérol de l'échantillon.

$$(\text{Aire de chaque stérol} / \text{total des aires}) \times 100$$

Les aires sont exprimés en .1*UV*sec

Ce sont ces dernières valeurs qui sont reprises dans les tableaux récapitulatifs.

2.4 Analyse des photographies

Les photographies des ovaires sont prises sur fond noir avec une échelle de 1mm.

Chaque paire d'ovaire photographiée a été analysée avec le programme image J afin de déterminer sa surface. Les photographies sont transformées en noir et blanc. A partir d'une échelle, le programme peut mesurer l'aire de chaque paire d'ovaire en mm².

2.5 Analyses des ecdystéroïdes

L'analyse de la composition en stéroïde des abeilles s'est faite au Biological Centre, Academy of Sciences of the Czech Republic, Department of Analytical Biochemistry, à Ceske Budejovice selon la méthode et avec l'aide de Michal Paroulek en collaboration avec l'Institut de Chimie organique et de Biochimie de Prague.

5 femelles d'*Apis mellifera*, 5 femelles de *Colletes cunicularius*, 5 femelles d'*Andrena vaga* ainsi que 3 larves d'*Apis mellifera* ont été analysées afin de déterminer si *Andrena vaga*, malgré son régime alimentaire particulier, synthétise la même hormone de mue que les femelles d'*Apis mellifera* décrit dans la littérature.

Préparation des échantillons

Les abeilles entières sont broyées dans 1ml de méthanol 90% (MeOH 90%) à l'aide d'une baguette en verre. Le tout est transféré dans un tube Eppendorf et vortexé.

Les tubes sont ensuite centrifugés 15 minutes à 8000 G pour ne récupérer que le surnageant dans un autre tube Eppendorf. Ces tubes sont mis à évaporer jusqu'à environ 5% de leur volume de départ.

1ml de méthanol 10% est ajouté dans chaque tube après évaporation pour remettre les différents culots en solution et vortexé.

Les échantillons sont ensuite filtrés sur des colonnes SPE OASIS HLB de Waters. Ces colonnes ont besoin d'être conditionnées avant la filtration avec 1ml de méthanol pur et 1ml de méthanol 10%. Les ecdystéroïdes sont accrochés dans la colonne, l'éluant utilisé pour les récupérer est du méthanol 90% (1ml).

Les échantillons récupérés sont de nouveaux évaporés puis remis en solution avec du méthanol 90% et transférés dans un autre tube. Ces tubes sont mis à évaporer une dernière fois.

Les échantillons doivent être en solution dans 50 µl de méthanol 10% pour être analysés.

50 µl de standard interne sont également ajoutés à l'échantillon pour vérifier la qualité de l'analyse.

Tous les échantillons seront analysés par une chromatographie en phase liquide. La phase mobile utilisée dans ce cas-ci est composée de méthanol et d'acétonitrile (50 :50)

2.6 Analyses statistiques

La première méthode statistique réalisée est une ANOVA sur les mesures des cellules radiales et sur l'aire des ovaires. Cette analyse permet de vérifier s'il existe une différence significative de taille entre les abeilles.

Les calculs faits sur les stéroïdes sont faits sur les données en pourcentage. Pour estimer un poids relatif des stéroïdes par abeille, une ANOVA est réalisée sur les poids des autres abeilles collectées.

Tous les pics de stéroïdes élués entre le cholestérol et le standard interne de bétuline permettent de déterminer le contenu stéroïdique total. Chaque stéroïde est exprimé en termes de pourcentage de stéroïdes totaux.

Le jeu de données à analyser consiste en un tableau de « cas X variable » de 37 lignes (37 individus analysés) et de 12 colonnes (11 variables quantitatives qui sont les différents stéroïdes, et 1 variable qualitative qui précise si les femelles étaient émergées ou non lors de leur collecte).

La composition stéroïdique des abeilles de chaque station est résumée en un tableau reprenant la moyenne, les valeurs maximales et minimales.

Une analyse en composante principale (ACP) permet d'étudier les relations entre toutes les variables en même temps. Cette méthode d'ordination permet également de déterminer les ressemblances et les dissemblances entre les individus.

Un dendrogramme (visualisation graphique d'une classification hiérarchique), accompagné de la fonction Indval, complète la méthode d'ordination. La fonction Indval précise les composés formant les différents groupes hiérarchiques.

3. Résultats

3.1 Ressource alimentaire

Le pollen scopal porté par les abeilles mis entre lame et lamelle confirme que le saule est l'unique ressource alimentaire d'*Andrena vaga*.



Figure 23 : pollen scopal d'*Andrena vaga* (n= 3) (Carreaux Gaëlle)

3.2 Histologie

Les coupes faites au microtome dans les ovaires des abeilles non-émergées, collectées le 17 mars 2010, montrent que les ovarioles ont déjà commencé à se développer avant même l'émergence des femelles. Il est difficile de distinguer précisément les différentes structures à cette étape de développement. Cependant, il est possible d'observer 3 ovarioles en formation.

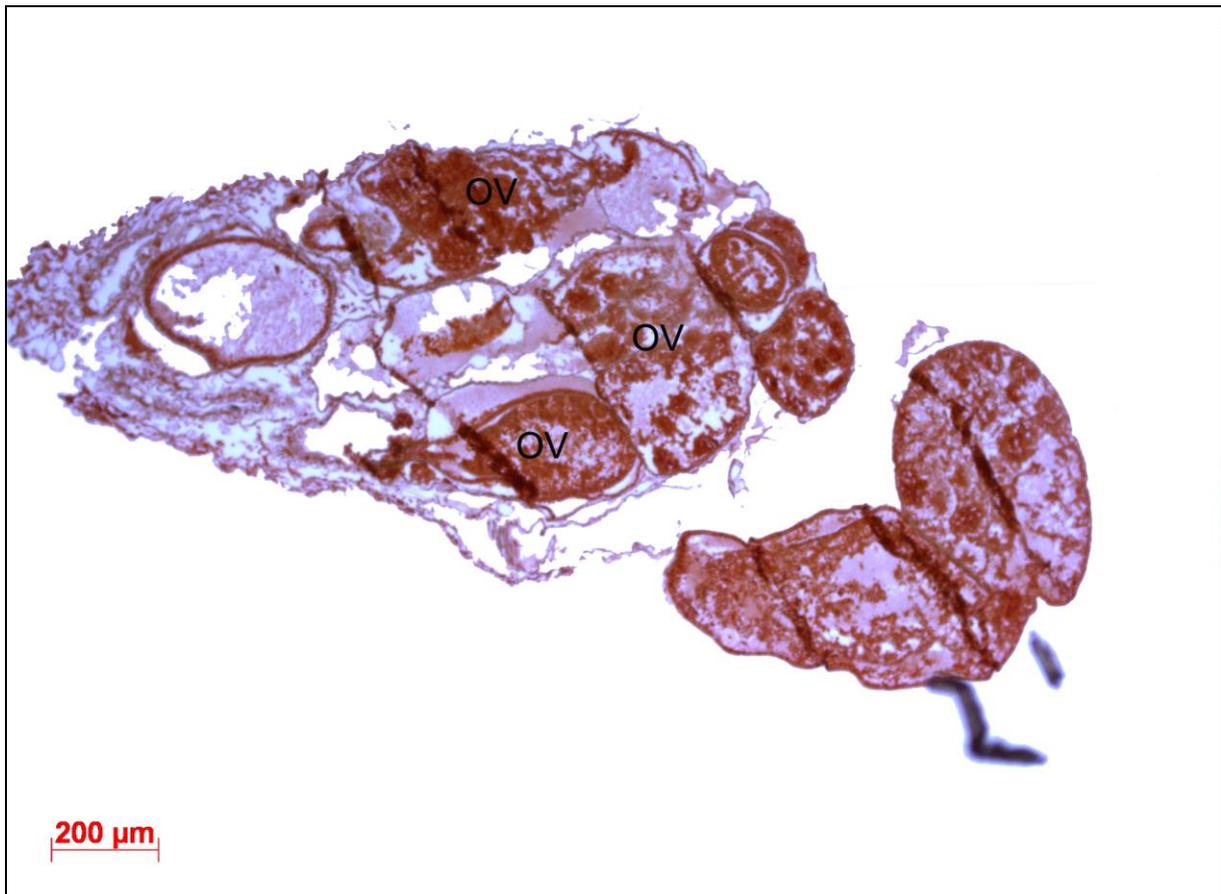


Figure 24 : Coupe histologique des ovaires d'une femelle non émergées (F1.20). OV : ovariole
(Carreaux G.)

Les ovarioles de femelles collectées à leur émergence (les 9 et 12 avril 2010) sont bien développées mais ne contiennent aucun follicule.

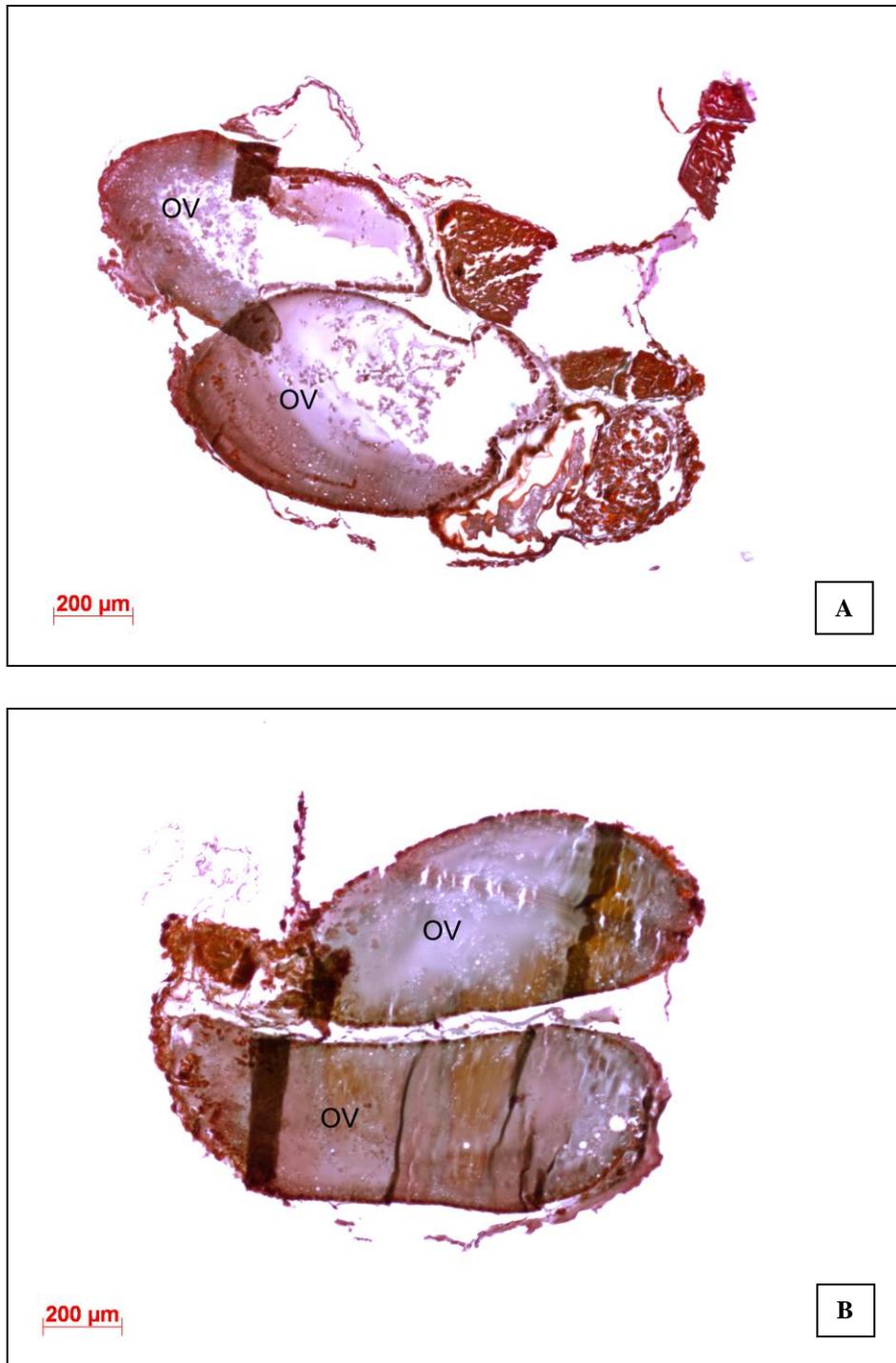


Figure 25 : coupe histologique des ovaires d'une femelle émergée (A : F2.55 ; B : F3.64). OV : ovariole (Carreaux G.)

Dans les ovaires de femelles collectées au milieu de leurs phénologies (13 avril 2010), les cellules souches se distinguent facilement à l'apex mais on ne peut toujours pas voir avec certitude les cellules germinales.

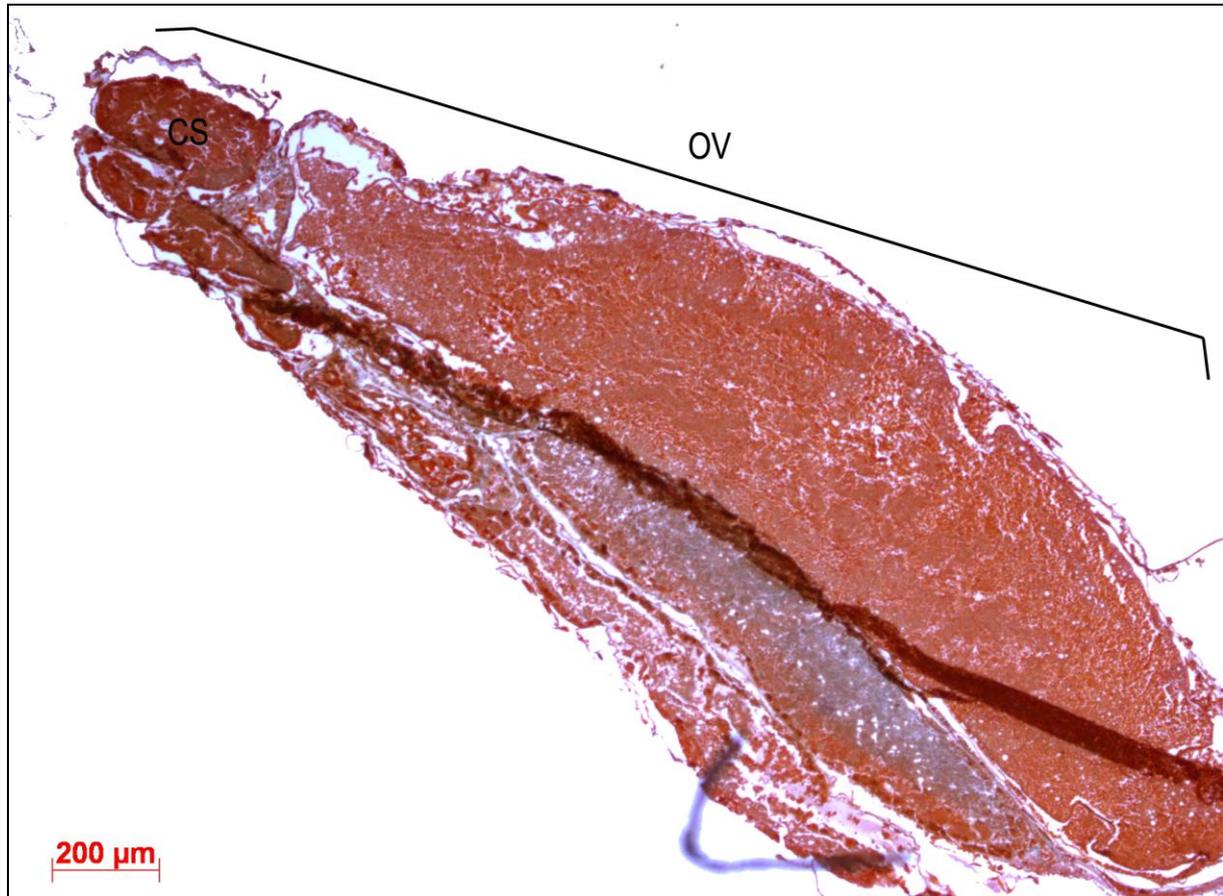


Figure 26 : coupe histologique des ovaires d'une femelle émergée (F4.72). OV : ovariole ; CS : cellules souches (Carreaux G.)

Ce n'est qu'à partir du 17 avril 2010 que l'on peut distinguer les différents segments composant l'ovaire. Il est possible de distinguer à l'apex les cellules souches. Dans le segment suivant, le germinarium, le nombre de cellules augmente.

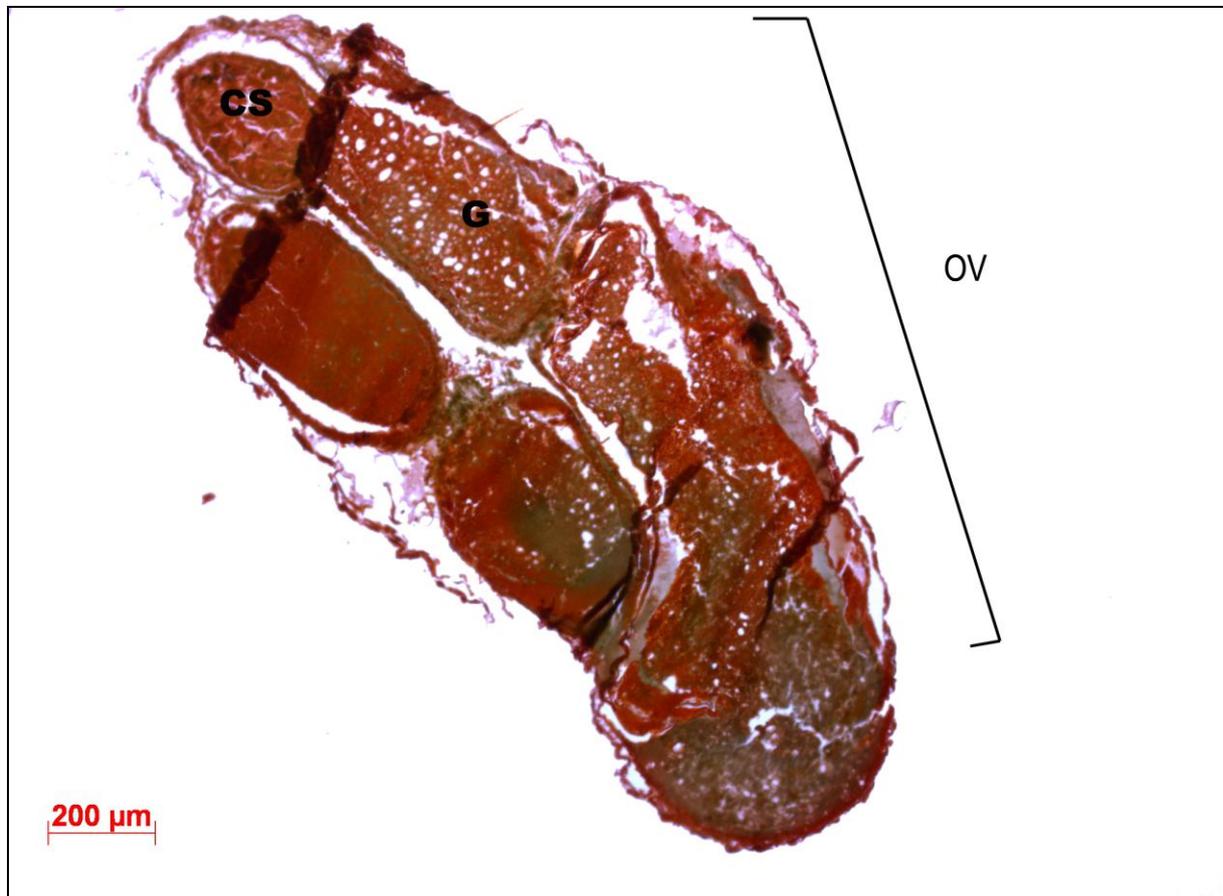


Figure 27 : coupe histologique des ovaires d'une femelle émergée (F5.85). CS : cellules souches ;
G : germinarium (Carreaux G.)

Au stade suivant présumé (23 avril 2010), on peut distinguer également les cellules souches et les cellules du germinarium mais aussi la présence de follicules c'est-à-dire d'œufs en formation.

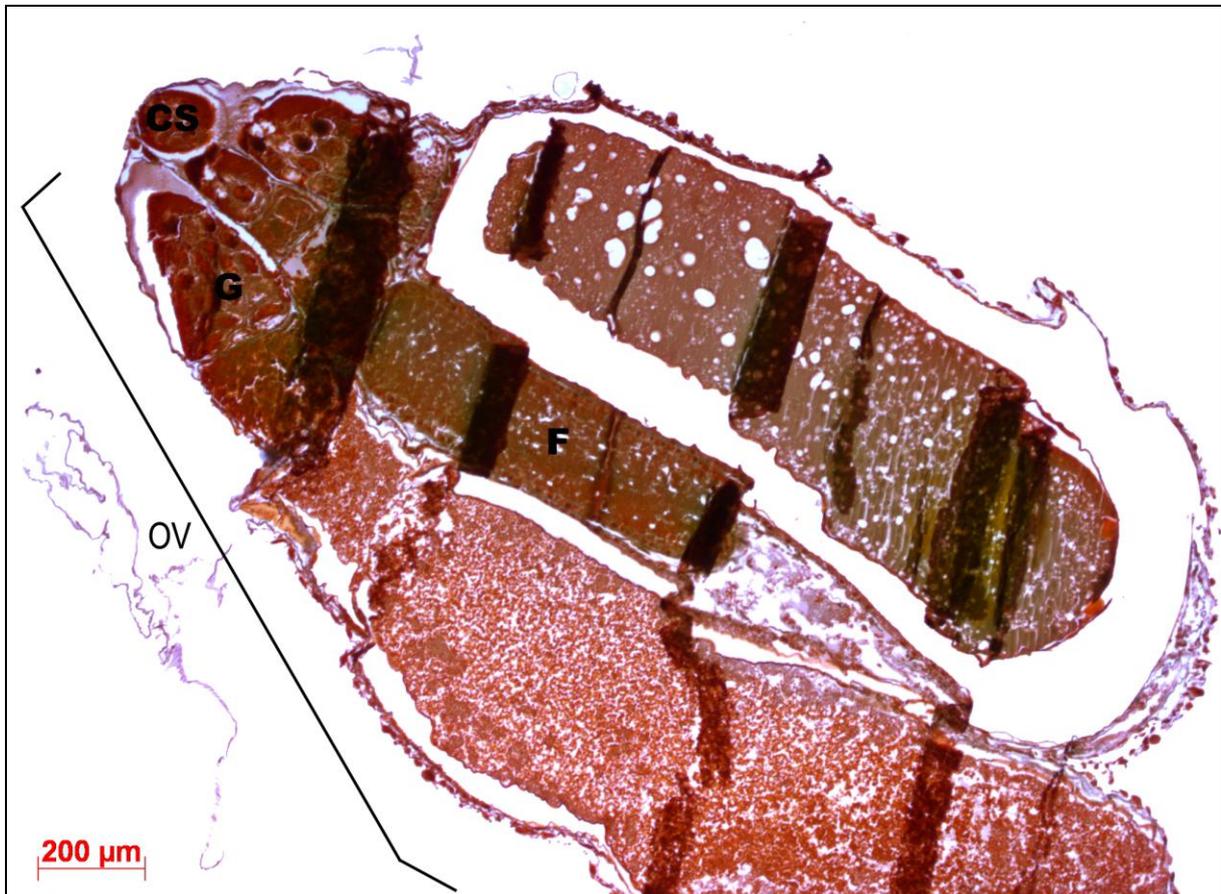


Figure 28 : coupe histologique des ovaires d'une femelle émergée (F6.87). CS : cellules souches ;
G : germinarium ; F : follicule (Carreaux G.)

C'est aussi à cette date que les premiers œufs pondus ont pu être observés sur le terrain dans les cellules creusées par *Andrena vaga*.

Lors de la dernière collecte (5 mai 2010), les ovaires des femelles ne présentaient plus que le chorion et la trace des pontes comme décrit par Velthuis (1970) au stade 8 de sa classification.

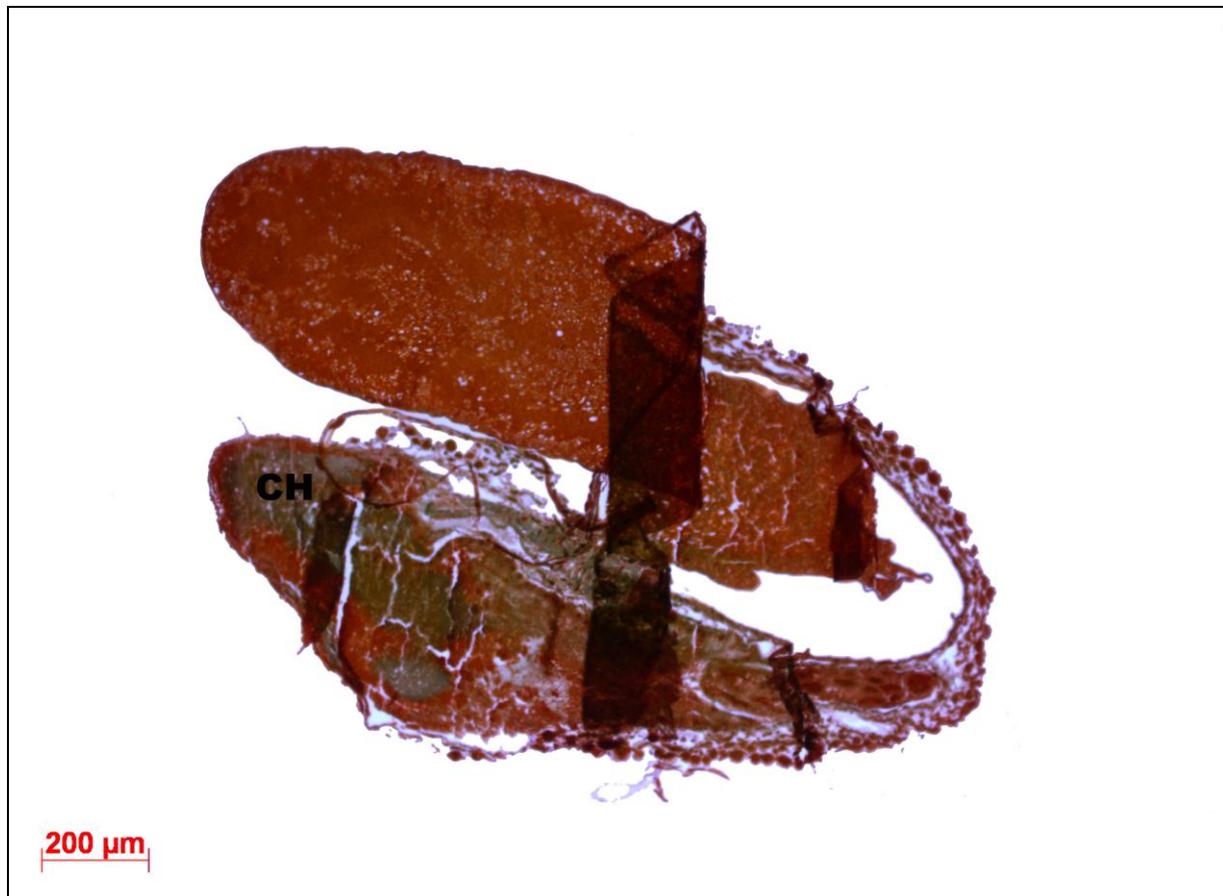


Figure 29 : coupe histologique des ovaires d'une femelle émergée (F7.97). CH : chorion (Carreaux G.)

Table 2 : Récapitulatif des différents stades ovariens observés ainsi que de leurs caractéristiques

<i>Stades supposés</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Dates de collecte</i>
Stade 1	ovarioles préformées	17-mars-10
Stade 2	ovarioles formées mais vide	9-avr-10
Stade 3	ovarioles formées	12-avr-10
	cellules souches facilement distinguables	13-avr-10
Stade 4	ovarioles formées	17-avr-10
	cellules souches et germinarium facilement distinguables	
Stade 5	ovarioles formées	23-avr-10
	cellules souches, germinarium et follicule distinguables	
Stade 6	uniquement trace de ponte chorion	5-mai-10

3.3 Stérols

3.2.1 Pollen scopal

Le stérol majeur est un composé encore inconnu appelé inconnue 496 en référence à sa masse. Outre cette inconnue, les stérols les plus représentés sont le β -sitostérol (26,83 %) et le Δ^5 -avénastérol (18,7 %). La fraction campestérol/24-méthylènecholestérol représente 2,25 % des stérols totaux (Tabl.3).

Table 3 : Composition stérolique du pollen scopal (n=3). Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (> 5 %). (Inconnue 496, composé majeur non identifié. 24-Méth.Chol. + Camp= 24-méthylène cholestérol + campestérol. MF = matière fraîche. X min = % minimum. X max= % maximum. X = % moyen).

Stérols	Pollen scopal		
	X min	X max	X + sd
Cholestérol	0,38	0,48	0,43 ± 0,04
Desmostérol	0	0,07	0,02 ± 0,03
24-Méthyl.Chol.+Camp.	2,1	2,39	2,25 ± 0,1
Stigmastérol	0,16	0,29	0,23 ± 0,5
Inconnue 484	2,16	2,28	2,22 ± 0,5
B-Sitostérol	25	28,37	26,83 ± 1,2
D5-Avé nastérol	17,69	19,34	18,7 ± 0,57
Cholesténone	0,94	2,26	1,46 ± 0,44
D7-Stigmastérol	0,25	1,23	0,59 ± 0,36
D7-Avé nastérol	1,58	2,76	2 ± 0,46
Inconnue 496	42,1	47,86	45,25 ± 2,44
	6849,48 µg/g	7928,17 µg/g	7278,22 ± 483,13
Teneur en stérols totaux	MF	MF	µg/g MF

G. Carreaux – Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroïde d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae) - 2011

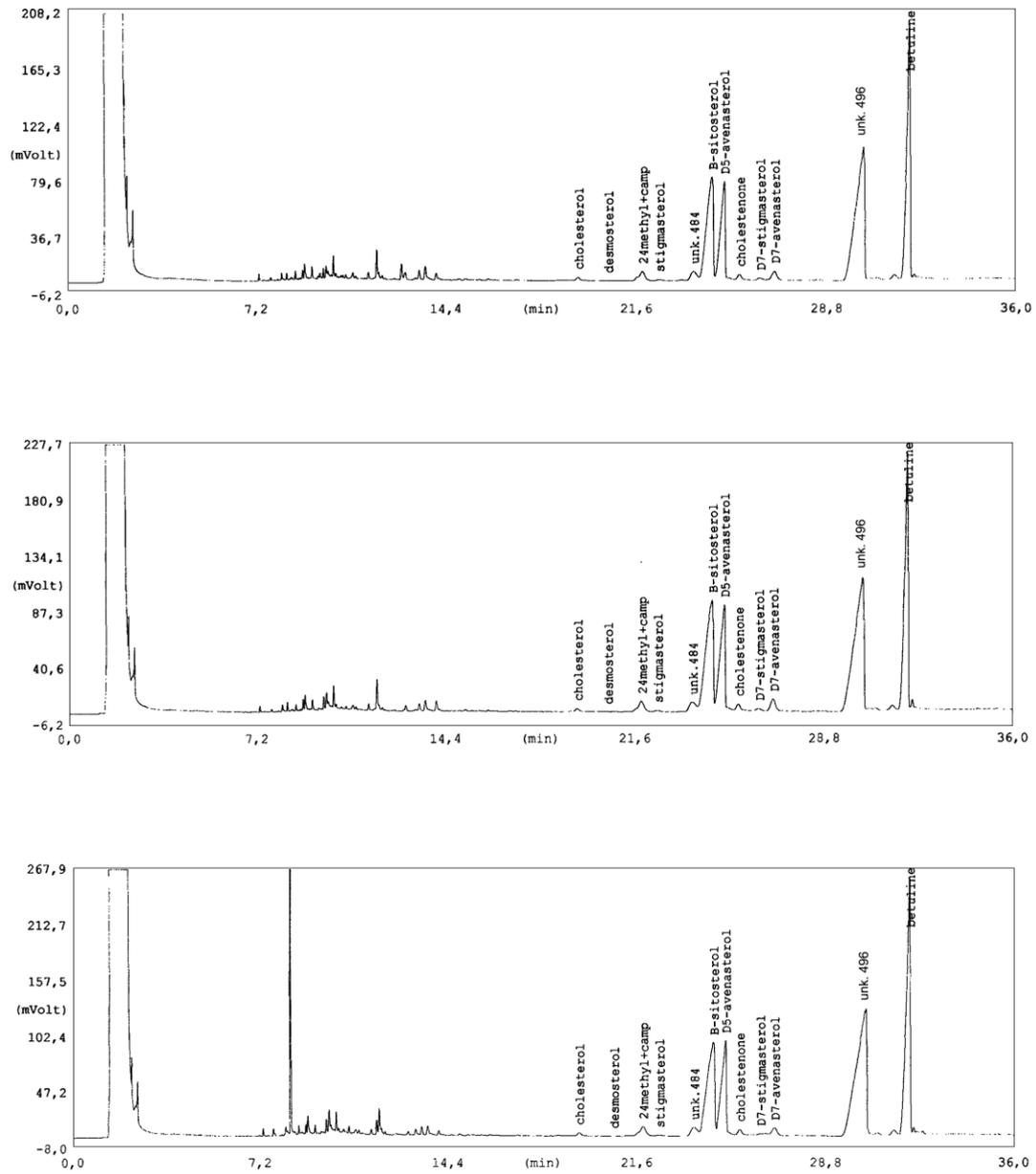


Figure 30 : Chromatogrammes des échantillons de pollen scopal (en haut : PS1 ; milieu PS2 ; bas : PS3)

3.2.2 Femelles non émergées

Les stérols les plus représentés dans les femelles non-émergées (n=19) sont le Δ^5 -avénastérol (38,03%), le β -sitostérol (30,77 %) et la fraction campestérol/24méthylènecholestérol (15,17 %) (Tabl.4).

Afin de calculer la teneur en stérols totaux, on utilise un poids moyen de toutes les femelles collectées le 17 mars 2010.

Table 4 : Composition stérolique des femelles d'*Andrena vaga* (n=15). Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (> 5%). Inconnue, composé majeur non identifié. 24-Méth.Chol. + Camp., 24-méthylène cholestérol + campestérol. MF = matière fraîche. X min = % minimum. X max= % maximum. X = % moyen.

Stérols	Femelles non émergées (n=15 ; collectées le 17 mars 2010)		
	X min	X max	X + sd
Cholestérol	1,61	6,13	5,95 ± 8,63
Desmostérol	0,01	0,81	0,33 ± 0,21
24-Méthyl.Chol.+Camp.	8,27	20,95	15,17 ± 3,58
Stigmastérol	0,04	3,2	0,24 ± 0,82
Inconnue 484	0,52	2,9	1,03 ± 0,78
B-Sitostérol	15,24	39,62	30,77 ± 6,86
D5-Avénastérol	24,73	59,88	38,03 ± 8,48
Cholesténone	0,17	7,57	3,44 ± 2,74
D7-Stigmastérol	0,005	3,71	0,29 ± 0,95
D7-Avénastérol	0,08	13,85	1,6 ± 3,52
Inconnue 496	0	0	0
Teneur en stérols totaux	195,35 µg/g MF	1050,76 µg/g MF	620,17 ± 279,06 µg/g MF

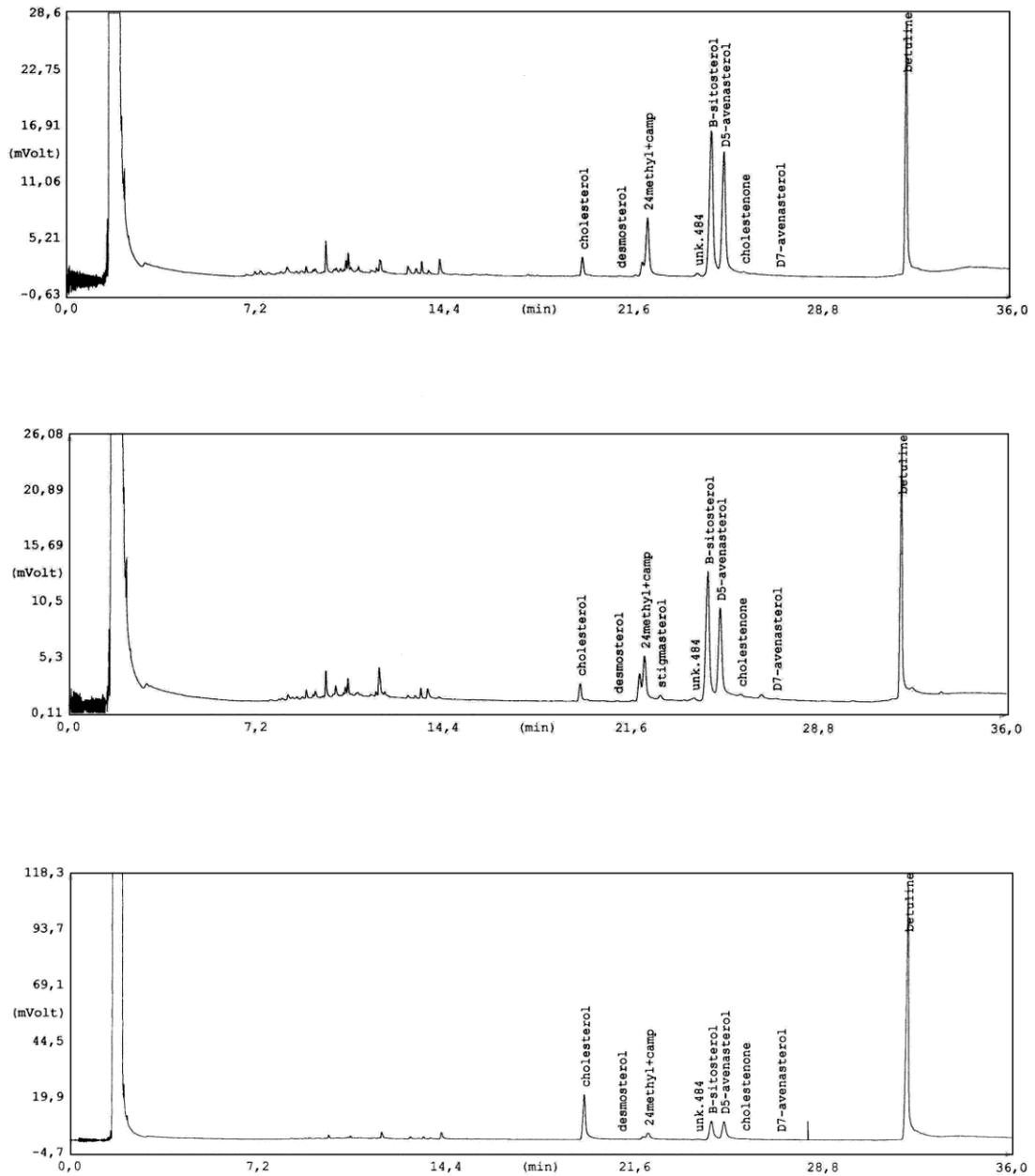


Figure 31 : Chromatogrammes de femelles non-émergées (en haut : F1.2 ; milieu F1.3 ; bas : F1.5)

3.2.3 Femelles émergées

Les stérols les plus représentés dans les femelles émergées sont le Δ 5-avénastérol (35,95 %), le β -sitostérol (40,96 %) et la fraction campestérol/24méthylènecholestérol (15,24 %). Mais aussi à 5,9 % l'inconnue 496. (Tabl.5).

Dans ce cas-ci, pour calculer la teneur en stérols totaux on utilise une moyenne faite sur toutes les abeilles émergées. Une ANOVA a été faite au préalable pour confirmer qu'il n'y avait pas de différence significative entre les moyennes des différentes dates de collecte (p_value : 0,065).

Table 5 : Composition stérolique des femelles d'*Andrena vaga* (n=20). Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (> 5%). Inconnue, composé majeur non identifié. 24-Méth.Chol. + Camp., 24-méthylène cholestérol + campestérol. MF = matière fraîche. X min = % minimum. X max= % maximum. X = % moyen

Stérols	Femelles émergées (n=20 ; collectées les 9, 12, 13, 17, 23 avril et le 5 mai 2010)		
	X min	X max	X + sd
Cholestérol	1,38	8,24	3,2 ± 1,51
Desmostérol	0,01	0,58	0,18 ± 0,13
24-Méthyl.Chol.+Camp.	9,95	21,02	15,24 ± 2,39
Stigmastérol	0	0,55	0,19 ± 0,17
Inconnue 484	0,88	1,71	1,25 ± 0,2
B-Sitostérol	33,81	47,04	40,96 ± 3,59
D5-Avénastérol	27,5	44,99	35,95 ± 3,75
Cholesténone	0	5	1,24 ± 1,23
D7-Stigmastérol	0	1,96	0,52 ± 0,55
D7-Avénastérol	0,33	9,83	1,26 ± 2,1
Inconnue 496	1,07	10,92	5,9 ± 3,4
Teneur en stérols totaux	400,11 µg/g MF	2678,48 µg/g MF	955,83 ± 506,7 µg/g MF

G. Carreaux – Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroïde d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae) - 2011

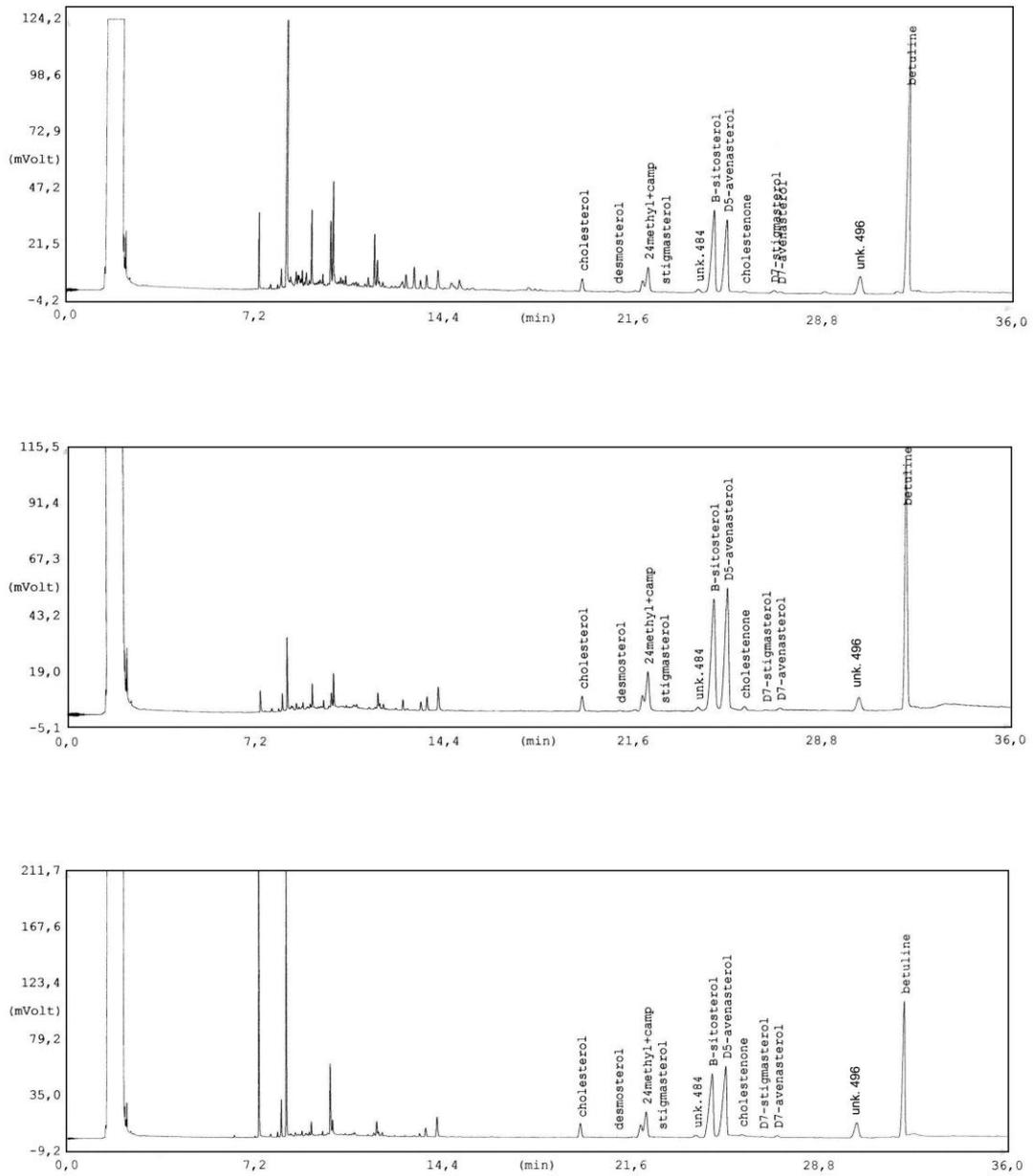


Figure 32 : Chromatogrammes de femelles émergées (en haut : F2.51 ; milieu F3.58 ; bas : F4.76)

G. Carreaux – Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroïde d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae) - 2011

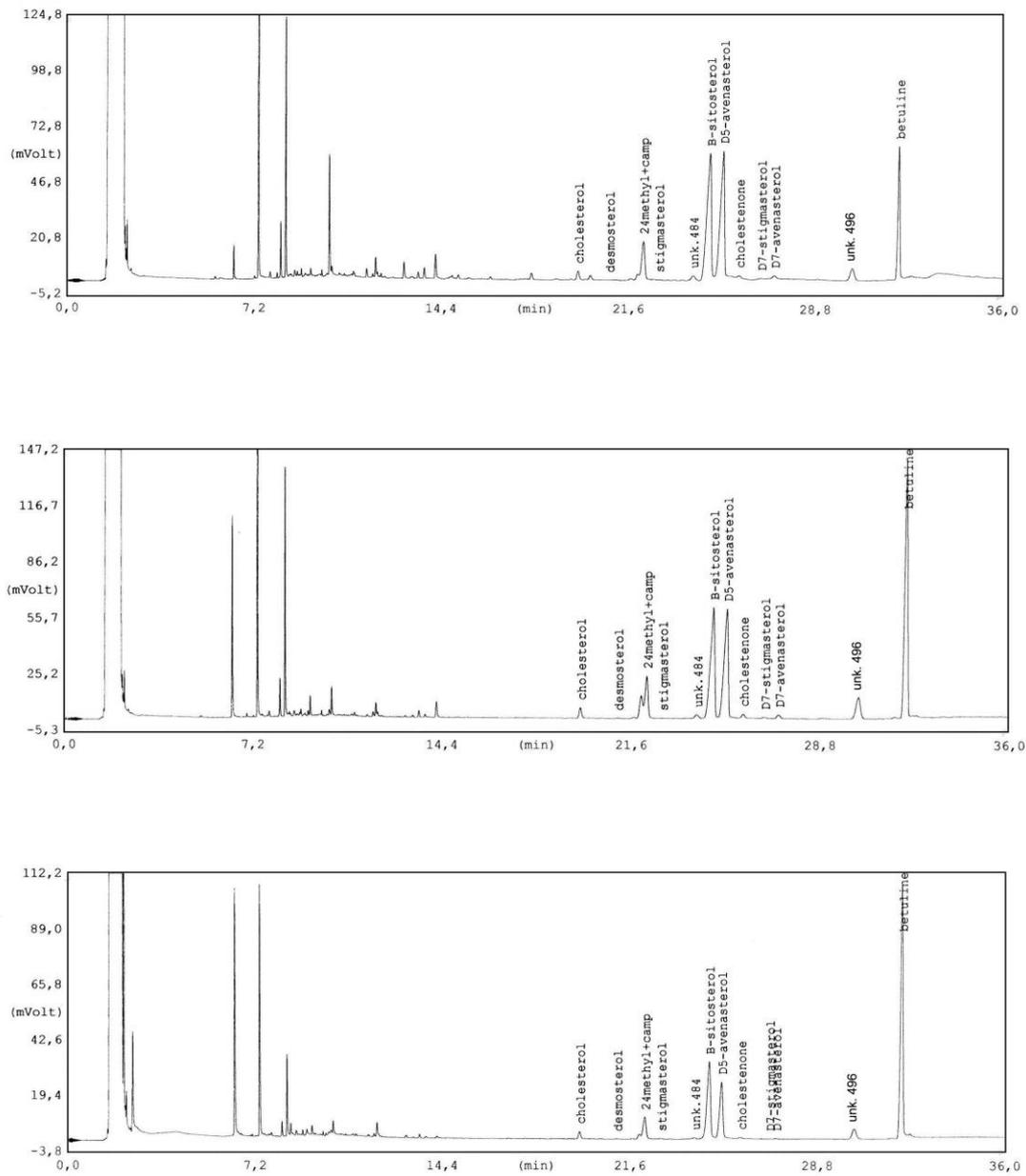


Figure 33 : Chromatogrammes de femelles émergées (en haut : F5.79 ; milieu F6.90 ; bas : F7.98)

3.3.4 Variabilités

Il est à noter que la concentration en inconnue 496 change durant la vie de la femelle. Il n'y a jamais d'inconnue 496 dans les profils stéroliques des femelles non émergées. Après l'émergence des abeilles, le pourcentage de ce stérol varie fortement d'une date de collecte à l'autre alternant un fort et un plus faible pourcentage (Fig. 34).

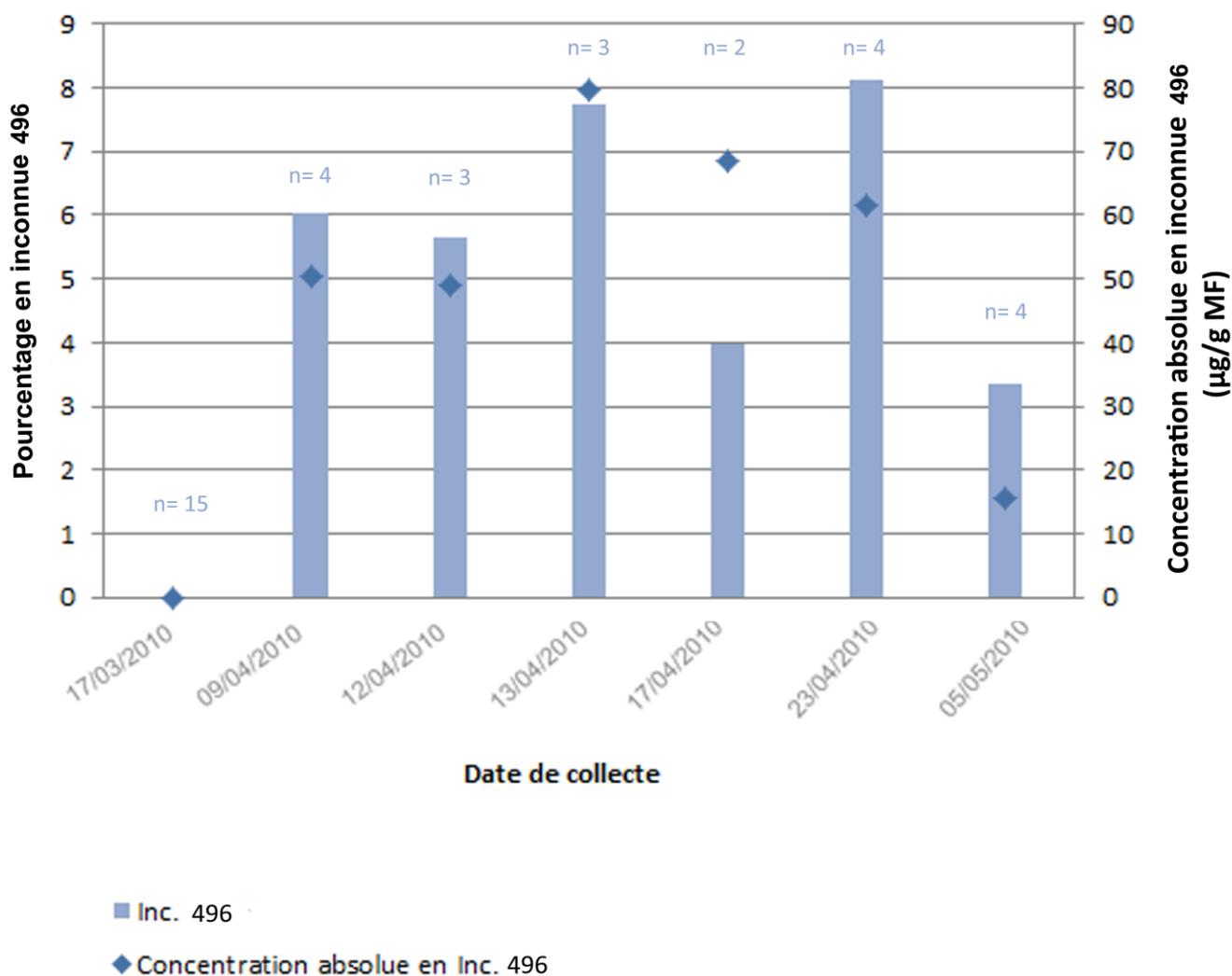


Figure 34 : Graphique du pourcentage et de la concentration absolue en inconnue 496 en fonction de la date de collecte des abeilles.

3.4 Développement ovarien

Les aires calculées grâce au programme image J ont une distribution normale. Le test paramétrique ANOVA montre qu'il existe une différence significative entre les aires selon la date de collecte ($p_value = 0,039$).

Cependant, les photographies des ovaires faites avant les analyses n'ont pas permis d'établir de classification ovarienne uniquement d'après leur aspect extérieur.

En effet, un ovaire en cours de développement est aussi petit qu'un ovaire après la ponte.

3.5 Ecdystéroïdes

Les analyses des ecdystéroïdes faites à Prague montrent qu'*Andrena vaga* contrairement à *Colletes cunicularius* ainsi qu'à *Apis mellifera* ne synthétise pas de makistéron A.

On peut remarquer sur les chromatogrammes une autre molécule non identifiée par les standards internes utilisés généralement.

Il est à noter que ces analyses d'ecdystéroïdes détectent, en plus de la makistéron A, la présence de 20-hydroxyecdysone chez *Apis mellifera*.

Table 6 : Composition en ecdystéroïdes des femelles et des larves d'abeilles. Les composés en italique sont considérés comme négligeables. NF= no found, 20E= 20-hydroxyecdysone, MaA= makistéron A, E= ecdysone, 2d20E= 2-deoxy-20-hydroxyecdysone, 2dE=2-deoxyecdysone.

<i>Espèces</i>	<i>pg par animal</i>				
	20E	MaA	E	2d20E	2dE
<i>Colletes cunicularius</i>	NF	498,1	NF	NF	NF
<i>Colletes cunicularius</i>	NF	498,1	NF	NF	NF
<i>Colletes cunicularius</i>	NF	5	NF	NF	NF
<i>Colletes cunicularius</i>	NF	5	NF	NF	NF
<i>Colletes cunicularius</i>	NF	5	NF	NF	NF
<i>Apis femelles</i>	4554,917	NF	NF	<i>6,11</i>	NF
<i>Apis femelles</i>	4554,917	NF	NF	<i>6,11</i>	NF
<i>Apis femelles</i>	4554,917	NF	NF	<i>6,11</i>	NF
<i>Apis femelles</i>	4554,917	NF	NF	<i>6,11</i>	NF
<i>Apis femelles</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Apis larvae</i>	<i>30,2</i>	1325,4	NF	NF	NF
<i>Apis larvae</i>	<i>30,2</i>	1325,4	NF	NF	NF
<i>Apis larvae</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Andrena vaga</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Andrena vaga</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Andrena vaga</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Andrena vaga</i>	NF	NF	NF	NF	NF
<i>Andrena vaga</i>	NF	<i>139,8</i>	NF	NF	NF

3.6 Statistique

3.6.1 ANOVA

3.6.1.1 La distance intertegulae

La distribution des distances intertegulae n'étant pas normale, un test de Kruskal-Wallis a été réalisé au lieu d'une ANOVA. Ce test non paramétrique permet de déterminer si il y a une différence significative entre les moyennes des distances intertegulae selon la station de collecte. Ce test nous renvoie une p-value de 62% (0,6182), les moyennes ne sont donc pas significativement différentes. Les femelles peuvent être considérées comme de même taille entre les stations.

3.6.1.2 La mesure des cellules radiales

La distribution des données étant normale, le test ANOVA nous renvoie une p-value de 12% (0,1204). Les moyennes ne sont donc pas significativement différentes. Les femelles peuvent être considérées comme de même taille entre les stations.

3.6.2 ACP

3.6.2.1 Ensemble des femelles

Le jeu de données est réduit à trois composantes principales exprimant 60 % de la variance totale. Le premier plan factoriel, défini par les composantes 1 et 2, permet de définir deux groupes principalement séparés par l'axe 1: l'un regroupant toutes les femelles non émergées; l'autre réunissant les femelles émergées (cercle rouge).

G. Carreaux – Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroïdique d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae) - 2011

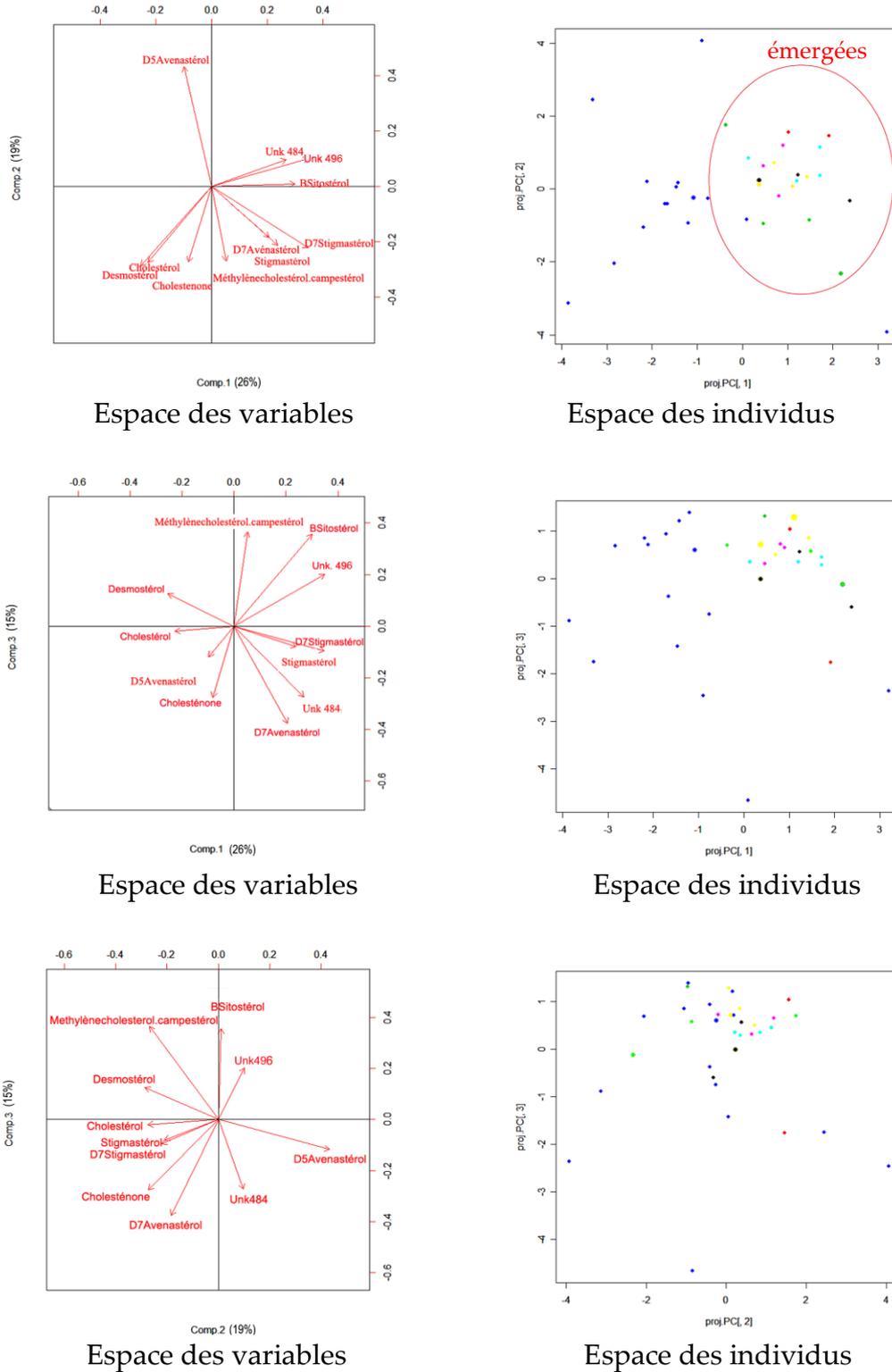
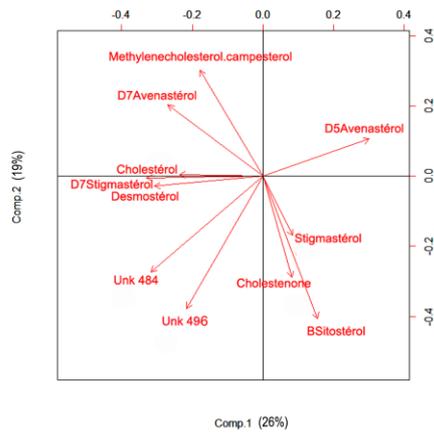


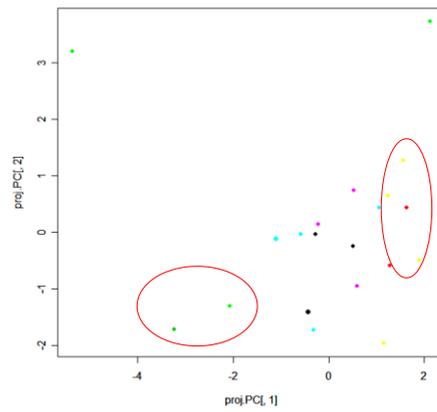
Figure 35 : Analyses en composantes principales de toutes les matrices envisagées pour *Andrena vaga*. A gauche, l'espace des variables représentant la participation de chaque stérol à chacune des composantes. A droite, l'espace des individus représentant la position de chaque échantillon par rapport à chacune des composantes. L'axe 1 exprime 26 % de la variance ; l'axe 2, 19 % et l'axe 3, 15 %. Station 1 : Bleu; station 2: Vert ; station 3 : Rose ; station 4 : Noir ; station 5 : Rouge ; station 6 : Turquoise ; station 7 : Jaune.

3.6.2.2 ACP femelles émergées

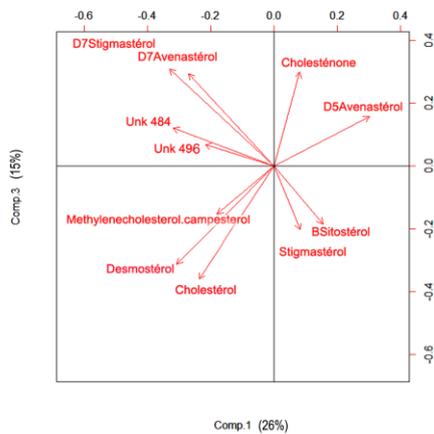
Le jeu de données est réduit à trois composantes principales exprimant 66 % de la variance totale. Le premier plan factoriel, défini par les composantes 1 et 2, permet de voir la répartition des dates de collecte selon la concentration en inconnue 496. En effet, les points de la station 7 (05 mai 2010) (jaune) sont les plus éloignés par rapport aux points de la station 2 (09 avril 2010) (vert).



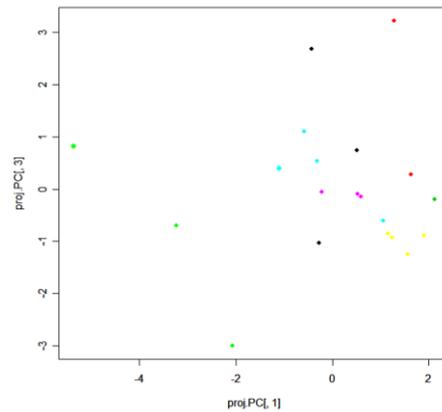
Espace des variables



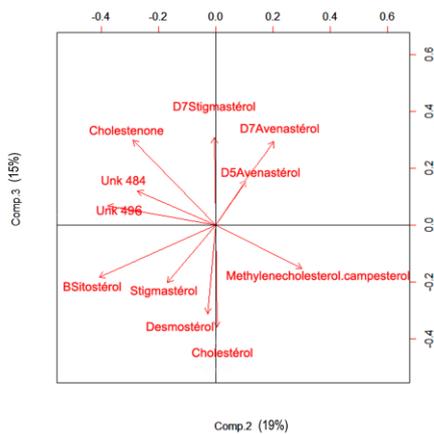
Espace des individus



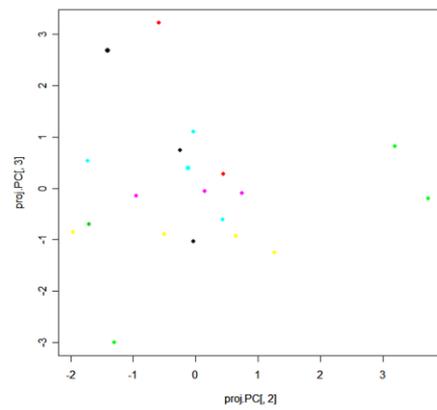
Espace des variables



Espace des individus



Espace des variables



Espace des individus

Figure 36 : Analyses en composantes principales des matrices des femelles émergées d'*Andrena vaga*. A gauche, l'espace des variables représentant la participation de chaque stérol à chacune des composantes. A droite, l'espace des individus représentant la position de chaque échantillon par rapport à chacune des composantes. L'axe 1 exprime 30 % de la variance ; l'axe 2, 20 % et l'axe 3, 16 %. Station 2: Vert ; station 3 : Rose ; station 4 : Noir ; station 5 : Rouge ; station 6 : Turquoise ; station 7 : Jaune.

3.5.3. Analyse de classification hiérarchique

Le dendrogramme UPGMA basé sur la matrice de corrélation calculée sur la matrice de toutes les femelles définit clairement deux groupes, l'un regroupant les femelles non émergées et l'autre les femelles émergées.

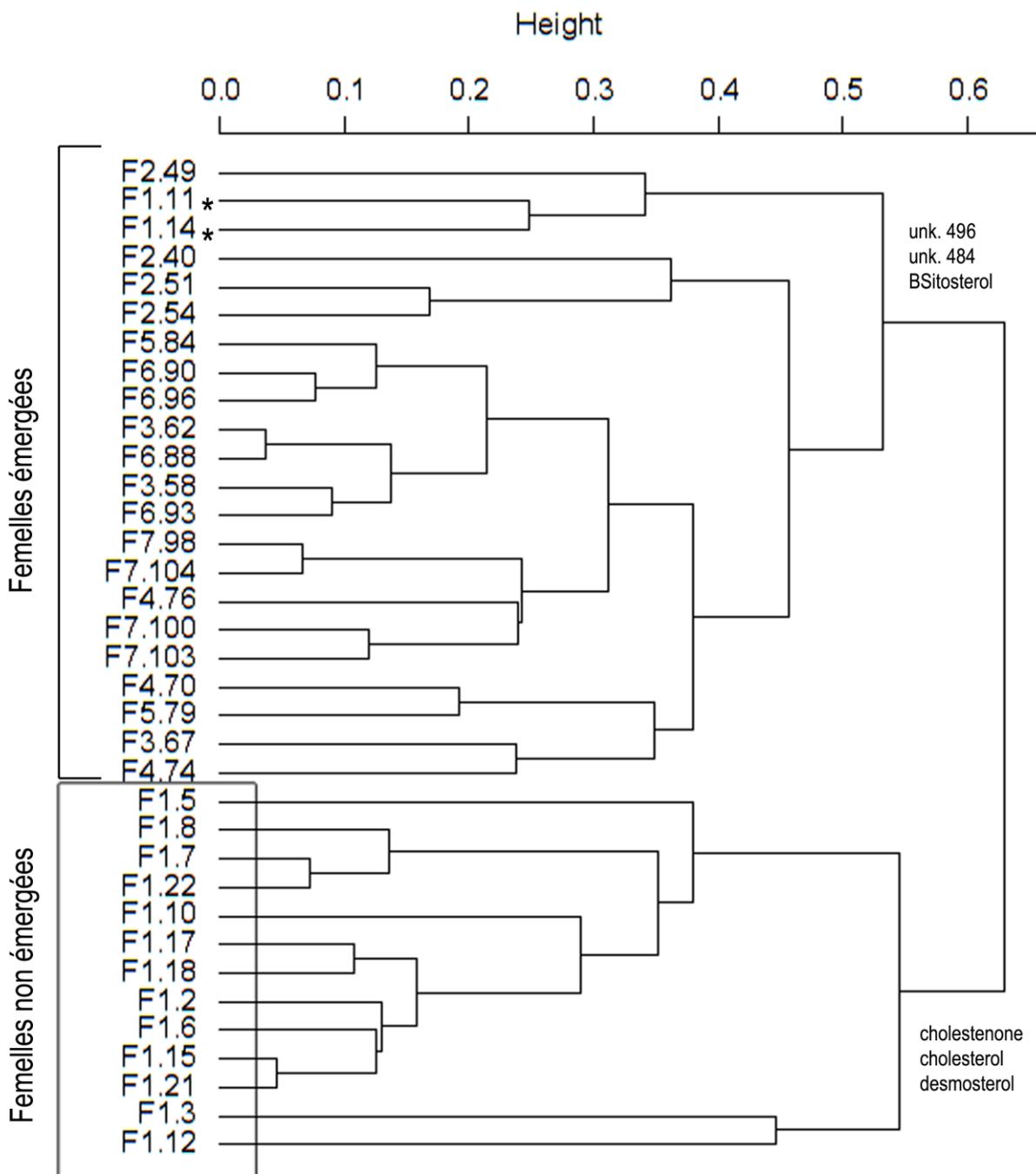


Figure 37 : Dendrogramme UPGMA sur base de la matrice de corrélation à partir de la matrice des profils stéroliques de toutes les femelles collectées (pourcentage en stérols totaux).

Seules 2 femelles non émergées se retrouvent avec les femelles émergées probablement en raison d'un problème de silylation ayant eu lieu avant l'injection en GC.

4. Discussion

4.1 Composition des ressources en pollen d'*Andrena vaga*

Les analyses stéroliques et l'observation au microscope du pollen scopal d'*Andrena vaga* confirment qu'elle ne collecte que du saule comme ressource pollinique. Cette observation confirme Bischoff *et al.* (2003) et Vanderplanck *et al.* (2009).

La composition stérolique du pollen de saule semble stable d'une année à l'autre. En effet, le pollen scopal analysé par Vanderplanck (2009) était composé à 37,65 % d'inconnue 496, à 28,67 % de β -sitostérol ainsi que de 19,57 % de Δ 5-avénastérol et contenait un faible pourcentage de 24-méthylènecholestérol (3,18 %). La composition du pollen de saule collecté sur les pattes d'*Andrena vaga* lors de ce travail concorde avec ces résultats.

Ceci confirme les résultats de Vanderplanck (2009) où elle montre qu'il n'y a pas de différence en ce qui concerne le stérol majoritaire entre le pollen floral et le pollen scopal contrairement à ce qui est repris dans la littérature (Winston, 1987 ; Roulston, 2005). L'étude de Roulston (2005) montre que durant la récolte du pollen par les femelles, la composition stérolique du pollen change de par l'ajout de nectar et de sécrétions glandulaire. Néanmoins ces études ont été menées uniquement sur *Apis mellifera*, espèce polylectique. Il semblerait que les espèces oligolectiques maintiennent une certaine stabilité de la composition stérolique du pollen qu'elles transportent.

4.2 Lien entre le développement ovarien et la composition stérolique

Il semble exister un lien entre le développement ovarien et la composition stérolique des femelles d'*Andrena vaga*. Une précédente étude (Human *et al.*, 2007) avait déjà montré un lien entre la composition du pollen et le développement ovarien. Néanmoins cette étude se focalisait sur les protéines.

Chez les femelles émergées, au début de leur période de vol et donc de leur alimentation, la concentration en Inconnue 496 reste assez élevée. Ensuite, elle diminue. En effet, c'est vers le 23 avril qu'apparaît pour la première fois un follicule sur les illustrations histologiques et des œufs sur le site de nidification. Les ovaires sont dès lors totalement matures mais nécessitent tout de même une grande concentration en hormone pour continuer à développer leurs œufs. A la fin de leur vie, la concentration en Inconnue 496 diminue à nouveau, les femelles ont pondus tous leurs œufs et cessent toute activité.

4.3 Métabolisme des stérols chez *Andrena vaga*

Chez *Andrena vaga*, il semble évident que le métabolisme requiert la présence d'un stérol particulier. Cette nécessité avait déjà été mise en évidence chez d'autres insectes, tels que la sauterelle (Behmer & Elias, 2000) et la drosophile mélanogaster (Clayton, 1964) pour d'autres stérols.

Selon la composition stérolique observée, *Andrena vaga* semble faire partie du groupe d'insectes phytophages incapables de désalkyler les phytostérols. Ce groupe comprend notamment *Apis mellifera* (Regali, 1996). Les tissus de ces insectes contiennent principalement du 24-méthylènecholestérol, du β -sitostérol et du Δ^5 -avénastérol comme dans le cas d'*Andrena vaga*.

Le stérol primordial pour *Andrena vaga* est le stérol non-identifié de masse 496. Il est aussi probable qu'*Andrena vaga* est capable d'assimiler ce stérol. En effet, chez les femelles non émergées ce stérol est toujours absent de leur composition

stérolique tissulaire. Au contraire, ce stérol est présent chez toutes les femelles émergées mais à des concentrations différentes selon la date de collecte.

Chez les femelles non émergées, le taux d'Inc. 496 est en-dessous des limites de détection témoignant de la métabolisation complète du composé probablement sollicité lors des différentes mues larvaires ainsi que pour le début de la maturation des ovaires.

Les analyses des stéroïdes semblent prouver qu'*Andrena vaga* ne synthétise pas la même hormone de mue qu'*Apis mellifera* et *Colletes cunicularius*., deux espèces polylectiques.

Apis mellifera a souvent été le sujet d'étude sur les stéroïdes (Bloch *et al.*, 2000). Le cas de *Colletes cunicularius*, lui, a peu été étudié. Collètes était avant considéré comme une espèce oligolectique spécialiste sur saule car elle n'avait été observée que sur *Salix sp.*. Cette espèce est en fait polylectique (Müller & Kuhlman, 2008). En effet, elle a pu être observée sur *Prunus sp.* ainsi que sur des Asteraceae. L'analyse des stéroïdes apporte une preuve de plus à cette constatation de par la présence de makistéron A. La plupart des espèces d'abeilles polylectiques semble synthétiser de la makistéron A en métabolisant probablement le 24-méthylènecholestérol. La makistéron A peut aussi être synthétisée, dans certains cas, par *Bombus terrestris* (Regali, 1996).

D'autres études faites notamment sur *Bombyx mori* (Lépidoptère) montrent que les maxima de concentration en ecdystéroïdes marquent les principaux événements du cycle de développement (la maturation, la ponte, le début de l'embryogenèse, la suite du développement après la diapause). Toutes les phases au cours desquelles se réalisent d'importants phénomènes morphogénétiques sont caractérisées par la présence prolongée d'un taux très élevé d'ecdystéroïdes. Au contraire, la vie larvaire et la diapause se passent en présence d'un faible taux d'ecdystéroïdes (Coulon *et al.*, 1979).

5. Conclusion

Les facteurs diététiques pourraient effectivement jouer un rôle clé dans les interactions plante-abeille. En effet, il semble que le métabolisme particulier d'*Andrena vaga* requiert la présence d'un stérol particulier encore inconnu de masse 496. Sa spécialisation sur le saule peut donc s'expliquer par l'abondance de ce stérol dans le pollen de *Salix* sp. Il n'est pas encore possible de dire que ce stérol ne soit pas présent chez d'autres plantes. Si c'était le cas, la spécialisation d'*Andrena vaga* sur le saule ne serait pas uniquement due à son métabolisme.

Le métabolisme d'*Andrena vaga* semble nécessiter l'Inconnue 496 pour synthétiser l'hormone de mue ecdystéroïde nécessaire à la maturation de ses ovaires et de ses œufs.

L'utilisation d'un stérol particulier s'accompagne donc également de la synthèse d'une hormone particulière. Cette constatation pourrait peut-être s'étendre à d'autres espèces d'abeilles solitaires oligolectiques.

Il est néanmoins important de déterminer et d'identifier ces inconnues pour confirmer ces résultats et peut-être ainsi trouver la voie métabolique qui permet de transformer l'Inconnue 496 en l'ecdystéroïde inconnu.

6. Perspectives

Afin de vérifier si l'Inconnue 496 est réellement le précurseur de l'hormone de mue ecdystéroïde, il serait bon d'analyser les ecdystéroïdes de façon quantitative et avec plus d'échantillons. Ces analyses pourront être comparées avec les compositions stéroliques d'individus collectés aux mêmes dates. Dès lors, une faible concentration en Inconnue 496 ainsi qu'une forte concentration en ecdystéroïde chez une même abeille constitueraient une preuve de l'assimilation et métabolisation de ce stérol en hormone de mue.

Il serait également utile de collecter plus de femelles non émergées à différentes dates pour déterminer à quel moment est utilisée l'inconnue 496.

Une autre étude envisagée est d'analyser la composition stérolique de *Salix* sp. présent dans des régions où *Andrena vaga* n'est pas observée. Le stérol inconnu 496 n'est peut-être pas abondant dans toutes les espèces de saule. Ceci expliquerait l'absence d'*Andrena vaga*.

7. Bibliographie

- Akihisa T., Kokke W.C.M.C. and Tamura T., 1991.** Naturally occurring sterols and related compounds from plants, p. 172–228 in: **Patterson G. W. and Nes W. D. (ed.)**, Physiology and Biochemistry of Sterols.
- Alexander B. A., 1992.** An exploratory analysis of the cladistic relationships within the superfamily Apoidea, with special reference to sphecid wasps (Hymenoptera). *Journal of Hymenoptera Research* **1**: 25-61.
- Barone R., 1999.** Evaluation faunistique et floristique de la Grande Bruyère de Blaton. Mémoire de fin d'étude, Université de Mons.
- Behmer S. T. and Elias D. O. 1999.** Phytosterol structure and its impact on feeding behaviour in the generalist grasshopper *Schistocerca Americana*. *Physiological Entomology* **24**: 18-27.
- Behmer S. T., Elias D. O. and Bernays E. A., 1999.** Postingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of suitable sterols in a generalist grasshopper. *The Journal of Experimental Biology* **202**: 739-748.
- Behmer S. T. and Elias D. O., 2000.** Sterol metabolic constraints as a factor contributing to the maintenance of diet mixing in grasshopper (Orthoptera : Acrididae). *Physiological and biochemical zoology* **73**(2): 219-230.
- Behmer S. T. and Nes W. D., 2003.** Insect sterol nutrition and physiology: A global overview. *Advances in Insect Physiology*, Vol 31. London, ACADEMIC PRESS LTD. **31**: 1-72.
- Bellman H., 1999.** Guide des abeilles, bourdons, guêpes et fourmis d'Europe. L'identification, le comportement, l'habitat. Delachaux et Niestlé, Paris, 336p.
- Bischoff I., Feltgen K. and Breckner D. 2003.** Foraging strategy and pollen preferences in *Andrena vaga* (Panzer) (Hym. Andrenidae) and *Colletes cunicularius* (L.) (Hym. Colletidae). *Journal of Hymenoptera Research* **12** (2): 220-237.
- Bloch G., Hefetz A. and Hartfelder K., 2000.** Ecdysteroid titer, ovary status, and dominance in adult worker and queen bumble bees (*Bombus terrestris*). *Journal of Insect Physiology* **46**: 1033-1040.

- Brothers D.J., 1999.** Phylogeny and evolution of wasps, ants and bees (Hymenoptera, Chrysidoidea, Vespoidea and Apoidea). *Zoological Scripta* **28**: 233-249.
- Cane J. H. and Sipes S. D. 2006.** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty, dans: Waser N.M. & Ollerton J. 2006. Plant-pollinator interactions from specialization to generalization. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 99-122.
- Chauvin R. 1968.** *Traité de biologie de l'abeille*. Tome 1. Masson, Paris, 547 pp.
- Clarck A. J. and Bloch K., 1959.** Function of sterols in *Dermestes vulpinus*. *The journal of Biological Chemistry* vol.234, no. 10, October 1959.
- Clayton R. B., 1964.** The utilization of sterols by insects. *The Journal of Lipids Research* **5**: 3-19.
- Coulon M., Calvez B., De Reggi M., Legay J.M. et Him M., 1979.** Variations des taux d'ecdystéroïdes au cours du développement de *Bombyx mori* ; rapport entre ces variations et les phases de croissance et de morphogénèse. *Experientia* **35**: 1120-1122.
- Cyberlipid center, website.** <http://www.cyberlipid.org/sterols/ster0003.htm>.
- Danforth B.N., Sipes S.D., Fang J. and Brady S.G., 2006.** The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the national Academy of Science of the United States of America* **103**: 15118-15123.
- Dinan L., 2001.** Phytoecdystéroïds: biological aspects. *Phytochemistry* **57**: 325-339.
- Dötterl, S., Fussel U., Jurgens A. and Aas G., 2005.** 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology* **31**(12): 2993-2998.
- Dötterl S. and Vereecken N., 2010.** The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology* **88**(7): 668-697.
- Eickwort G.C. and Ginsberg H.S. 1980.** Foraging and mating behavior in Apoidea. *Annual Review of Entomology* **25**: 421-446

Encyclopédie-universelle, website.

<http://www.encyclopedie-universelle.com/abeille1/abeille-apidae-apini-apis-mellifera3.html>

Exeler N., Kratochwil A. and Hochkirch A., 2008. Strong genetic exchange among populations of a specialist bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera : Andrenidae). *Conservation Genetics* 9(5): 1233-1241.

Fellendorf M., Mohra C. and Paxton R., 2004. Devastating effects of river flooding to the ground-nesting bee, *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae), and its associated fauna. *Journal of Insect Conservation* 8: 311-322.

Feldlaufer M. F., Svoboda J. A. and Herbert E. W. Jr, 1986. Makisterone A and 24-methylecholesterol from the ovaries of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experientia* 42: 200-201.

Gabe M., 1968. Techniques histologiques. Masson & Cie, 1968, 1046p.

Gilbert L. I., Tybczynski R. and Warren J. T., 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* 47: 883-916.

Gilbert S. F., 2004. Biologie du développement. 2^{ème} édition De Boeck.

Grassé P-P., 1977. Traité de zoologie: anatomie, systématique, biologie. Tome VIII Fascicule V-A. Masson , Paris, 680 p.

Guirguis G.N. and Brindley W.A., 1974. Insecticide susceptibility and response to selected pollens of larval leafcutting bees, *Megachile pacifica* (Panzer) (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* 3: 691-694.

Gusenleitner F. and Schwarz M., 2002. Weltweite checkliste der Bienengattung *Andrena* mit Bemerkungen und Ergänzungen zu paläarktischen Arten (Hymenoptera, Apidae, Andreninae, *Andrena*). *Entomofauna* 12: 1-1280.

Gutzeit, H. O., D. Zissler and Fleig R., 1993. Oogenesis in the Honeybee *Apis Mellifera* - Cytological Observations on the Formation and Differentiation of Previtellogenic Ovarian Follicles. *Roux's Archives of Developmental Biology* 202(3): 181-191.

Harder L.D. and Barrett S.C.H. 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: Effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* 74:1059-1072.

- Hobson R. P., 1935.** On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae. *Biochemical Journal* September; **29**(9): 2023–2026.
- Hoover S. E. R., Higo H. A. and Winston M. L., 2006.** Worker honey bee ovary development: seasonal variation and the influence of larval and adult nutrition. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **176**(1): 55-63.
- Houston T.F., 1990.** Descriptions of new paracolletine bees associated with flowers of *Eremophila* (Hymenoptera: Colletidae). *Records of the Western Australian Museum* **14**: 583-621.
- Houston T.F., 1991.** Two new and unusual species of the bee genus *Leiproctus* Smith (Hymenoptera: Colletidae), with notes on their behaviour. *Records of the Western Australian Museum* **15**: 83-96.
- Human, H., S. W. Nicolson, Strauss K., Pirk C. W. W. and Dietemann V., 2007.** Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology* **53**(7): 649-655.
- Iwata K. and Sakagami S.F., 1966.** Gigantism and dwarfism in bee eggs in relation to the modes of life, with notes on the number of ovarioles. *Japanese Journal of Ecology*, **16**, 4–16.
- Iwata K., 1976.** *Evolution of Instincts: Comparative Ethology of Hymenoptera*. New Delhi: Amerind. 535 p.
- Kleijn D. and Raemakers I., 2008.** A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* **89**(7), p. 1811-1823.
- Kugler J., Orion T. and Ishay J., 1976.** The number of ovarioles in the vespinae (Hymenoptera). *Insectes Sociaux* **23**: 525-533.
- Levin M.D. and Haydak M.H. 1957.** Comparative value of different pollens in the nutrition of *Osmia lignaria* Say (Hymenoptera: Apoidea). *Bee World* **38**: 221-226.
- Li Y., Warren J. T., Boyen G., Gilbert L. I., Gold A., Sangaiah R., Ball L. M. and Swenberg J. A., 2006.** Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **20**(2): 185-192.

- Lognay G., Dreze P., Wagstaffe P.J, Marlier M. and Severin M., 1989.** Validation of a quantitative procedure for the extraction of sterols from edible oils using radiolabelled compounds. *The Analyst* **114**: 1287-1291.
- Lognay G., Boenke A., Wagstaffe P.J, and Severin M. 1992.** Edible fats and oils reference materials for sterol analysis with particular attention to cholesterol. Part I. Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. *The Analyst* **117** (7): 1093-1097.
- Martins G. F. and J. E. Serrão, 2004.** A comparative study of the ovaries in some brazilian bees. *Papéis Avulsos de Zoologia* Vol **44**: 45-53.
- Michener C.D., 2007.** The bees of the world, second edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 913 p.
- Michez D., 2007.** La nouvelle classification des abeilles (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes) ou la chute de l'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) de son piédestal. *Osmia* **1** : 23-26.
- Michez D., Patiny S., Rasmont P., Timmermann K. and Vereecken N.J., 2008.** Phylogeny and host-plant evolution in Mellitidae s.l. (Hymenoptera : Apoidea). *Apidologie* **39**: 146-162.
- Moore P. D., Webb J. A. and Collinson M. E., 1978.** Pollen analysis. Second edition, Blackwell scientific publications, 1991.
- Müller A., 1995.** Morphological specializations in Central European bees for the uptake of pollen from flowers with anthers hidden in narrow corolla tubes (Hymenoptera, Apoidea). *Entomologia Generalis* **20**: 43-57.
- Müller A., 2006.** Unusual host-plant of *Hoplitis pici*, a bee with hooked bristles on its mouthparts (Hymenoptera : Megachilidae : Osmiini). *European Journal of Entomology* **103**: 497-500.
- Müller A., Kuhlmann M., 2008.** Pollen hosts of western Palaearctic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society* **95**: 719-733.
- O'Neil K. M. and Pearce A. M., 2007.** Ovary structure and oocyte size in relation to female size and age in the brood parasitic wasp *Stizoides renicinctus* (Say) (Hymenoptera: Crabronidae). *Proceedings of Entomological Society of Washington* **109**(4), pp. 836-840.

- Parker F.D. and Tepedino V.J., 1982.** A nest and pollen collection records of *Osmia sculleni* Sandhouse, a bee with hooked hairs on mouthparts (Hymenoptera : Megachilidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **51**: 145-173.
- Pasteels J.J. and Pasteels J.M., 1979.** Etude au microscope électronique à balayage des scopas collectrices de pollen chez les Andrenidae (Hymenoptera: Apoidea: Andrenidae). *Archives de Biologie* **90**: 113-130.
- Paxton R. J., 2005.** Male mating behaviour and mating systems of bees: an overview. *Apidologie* **36** : 145-156.
- Pouvreau A. 2004.** Les insectes pollinisateurs. Delachaux et Niestlé, Paris, 192p.
- Praz, C. J., A. Mueller and Dorn S., 2008a.** Specialized bees fail to develop on non-host pollen: Do plants chemically protect their pollen? *Ecology* **89**(3): 795-804.
- Praz, C. J., A. Muller and Dorn S., 2008b.** Host recognition in a pollen-specialist bee: evidence for a genetic basis. *Apidologie* **39**(5): 547-557.
- Regali A, 1996.** Contribution à l'étude des besoins alimentaires en stéroïdes de *Bombus terrestris* (L.). Thèse de doctorat, Université de Mons.
- Robbins W. E., Kaplanis J. N., Svoboda J. A. and Thompson M. J., 1971.** Steroid metabolism in insects. *Annual Review of Entomology* **16**: 53–72.
- Roulston T.H. 2005.** Pollen as a reward, in: **Dafni A., Kevan P.G. and Husband B.C., 2005.** *Practical Pollination Biology*. Enviroquest, Cambridge, pp. 234-260.
- Rozen J.G. Jr., 2003.** Eggs, ovariole numbers, and modes of parasitism of cleptoparasitic bees, with emphasis on Neotropical species (Hymenoptera: Apoidea). *American Museum Novitates*, **3413**, 1–36.
- Sakagami S. F. and Akahira Y., 1958.** Comparison of ovarian size and number of ovarioles between the workers of Japanese and European honeybees. (Studies on the Japanese honeybee, *Apis indica cerana* Fabr. I). *Kontyu* **26** : 103--109.
- Sedivy C., Müller A. and Dorn S., 2011.** Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*.

- Shinn A.F., 1967.** A revision of the bee genus *Calliopsis* and the biology and ecology of *C. andreniformis* (Hymenoptera: Andrenidae). University of Kansas Science Bulletin **46**:753-936.
- Smith, A. R., Seid M. A., Jiménez L. C. and Wcislo W. T., 2010.** Socially induced brain development in a facultatively eusocial sweat bee *Megalopta genalis* (Halictidae). Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **277**(1691): 2157-2163.
- Svoboda J. A. and Robbins W. E., 1968.** Desmosterol as a common intermediate in the conversion of a number of C28 and C29 plant sterols to cholesterol by the tobacco hornworm. *Experientia* **24/11**: 1131-1132.
- Svoboda J. A., Thompson M.J., Robbins W.E. and Kaplanis J.N., 1978.** Insect Steroid Metablism. *Lipids* **13**, 742-753.
- Svoboda J. A., Thompson M. J., Herbert E. W Jr., Shorting T. J. and Szczepanik-vanleeuwen P. A., 1982.** Utilization and Metabolism of Dietary Sterols in the Honey Bee and the Yellow Fever Mosquito. *Lipids* **17**, 220-225.
- Svoboda J. A., Herbert E. W. Jr, Thompson M. J. and Fedlaufer M. F., 1986.** Selective Sterol transfer in the Honey Bee: Its significance and relationship to Other Hymenoptera. *Lipids* **21**, 97-101.
- Svoboda J. A. and Feldlaufer M. F., 1991.** Neutral Sterol Metabolism in Insectes. *Lipids* **26**, 614-618.
- Svoboda J. A. and Lusby W. R. 1994.** Variability of sterol utilization in stored-products insects. *Experientia* **50**: 72–74.
- Svoboda J. A., Schiff N. M. and Feldlaufer M. F., 1995.** Sterol composition of three species of sawflies (Hymenoptera: Symphyta) and their dietary plant material. *Experientia* **51**: 150-
- Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website.**
Inventaires des Sites de Grandes Interêt Biologique.
<http://biodiversite.wallonie.be/cgi/sibw.sgib.form.pl?SGIBCODE=676#>
- Tasei J.N. and Masure M.M., 1978.** Sur quelques facteurs influançant le développement de *Megachile pacifica* Panz. (Hymenoptera: Megachilidae). *Apidologie* **9**: 273-290.

- Thorp R.W., 1979.** Structural, behavioural, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **66**: 788-812.
- Thorp R.W., 2000.** The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution* **222**: 211-223.
- Thummel C. S. and Chory J., 2002.** Steroid signaling in plants and insects-common themes, different pathways. *Genes & Development* **16** (24): 3113-3129.
- Vanderplanck M., 2009.** Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires spécialistes sur saule. Mémoire de fin d'étude, Université de Mons.
- Vanderplanck M, Bruneau E. and Michez D., 2009.** Oligolectisme et décalage phénologique entre plante hôte et pollinisateur : étude de deux espèces printanières psammophiles, *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera, Colletidae) et *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae). *Osmia* n°3: 22-26.
- Vanderplanck M., Michez D., Vancraenenbroeck S. and Lognay G., 2011.** Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical Letters*, 44: 1-14.
- Velthuis H. H. W., 1970.** Ovarian development in *Apis Mellifera* worker bees. *Entomologia Experimentalis et applicata* **13**: 377--394.
- Vie, website consulté en avril 2011.**
<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/cholesterol/cholesterol.html>
- Winston M., 1987.** *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge.
- Wcislo W.T., Cane J.H. 1996.** Floral resource utilization by solitary bees (Hymenoptera : Apoidea) and exploitation of their stored foods by natural enemies. *Annual Review of Entomology* **41** : 257-286

8. Annexe

Les individus en gris sont ceux utilisés lors des analyses stéroïdiques.

Espèce	Ind.	Station	Date de collecte	Non émergée / émergée	Récolteur
<i>Andrena vaga</i>	F 1.1	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.2	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.3	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.4	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.5	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.6	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.7	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.8	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.9	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.10	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.11	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.12	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.13	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.14	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.15	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.16	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.17	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.18	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.19	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.20	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.21	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.22	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.23	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.24	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.25	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 1.26	1	17.III.2010	Non émergée	Carreaux G., Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.40	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.41	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.42	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.43	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.44	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.45	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.46	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.47	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.48	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.49	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.50	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.51	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.52	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.53	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.54	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.55	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 2.56	2	9.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.57	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.

G. Carreaux – Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroïdique d'*Andrena vaga* (Panzer)
(Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae) - 2011

<i>Andrena vaga</i>	F 3.58	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.59	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.60	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.61	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.62	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.63	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.64	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.65	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.66	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.67	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.68	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 3.69	3	12.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.70	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.71	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.72	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.73	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.74	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.75	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 4.76	4	13.IV.2010	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.77	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.78	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.79	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.80	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.81	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.82	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.83	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.84	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.85	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 5.86	5	17.IV.2010	Emergée	Michez D.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.87	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.88	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.89	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.90	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.91	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.92	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.93	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.94	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.95	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 6.96	6	23.IV.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.97	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.98	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.99	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.100	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.101	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.102	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.103	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.104	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.105	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.
<i>Andrena vaga</i>	F 7.106	7	5.V.10	Emergée	Carreaux G.