UNIVERSITÉ DE MONS

—

FACULTÉ DES SCIENCES

—

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Adaptation comportementale au polylectisme chez les abeilles (Hymenoptera, Apoidea)

Directeur de mémoire :
Dr. Denis Michez

Mémoire de fin d'Études présenté par **Pierre-Laurent Zerck**
En vue de l'obtention du grade de **Maître en Biologie des Organismes et Écologie**

Année académique 2012-2013

P.-L. Zerck. 2013. Adaptation comportementale au polylectisme chez les abeilles (Hymenoptera, Apoidea). Mémoire en Sciences Biologiques, Université de Mons, 82p.

Résumé :

Les abeilles (Hymenoptera, Apoidea) font partie des pollinisateurs les plus importants des plantes à fleur. En contre partie, les plantes fournissent aux abeilles l'ensemble de leurs ressources alimentaires, pollen et nectar, contenant les éléments essentiels à leur développement : sucres, protéines et stérols. Le métabolisme stérolique de ces insectes est probablement un aspect clef de leur physiologie. N'étant pas capables de synthétiser *de novo* les stérols, leur alimentation est la seule source de ce composé. Chez les insectes, il est connu que les stérols, et plus particulièrement le cholestérol (C27), sont les précurseurs de l'hormone de mue. Ils sont également des constituants cellulaires et interviennent dans la maturation des ovarioles des femelles. Une carence en stérols peut donc s'avérer fatale. Pour les insectes phytophages comme les abeilles, la majorité des stérols végétaux sont des phytostérols qui présentent généralement un ou deux carbones supplémentaires par rapport au cholestérol. De plus, les phytostérols varient selon les espèces de plantes. La stratégie des abeilles pour pallier à ce manque de cholestérol est d'utiliser d'autres stérols particuliers comme précurseurs de leur hormone de mue qui est également différente.

Toutes les abeilles ne récoltent pas tous les pollens. Deux grands régimes alimentaires se distinguent au sein de ce groupe d'Hyménoptères : l'oligolectisme et le polylectisme. Certains aspects physiologiques et comportementaux d'*Apis mellifera*, une abeille généraliste (i.e. abeille polylectique), laissent présager qu'une des adaptations au polylectisme pourrait être l'ajout d'un composé stérolique dans leurs pelotes de pollen. Cet ajout pourrait pallier à l'absence d'un stérol nécessaire au métabolisme de l'abeille et éventuellement absent dans le pollen de la plante. Ce comportement ne serait en revanche pas rencontré chez les abeilles spécialistes (i.e. abeille oligolectique). L'objectif principal de ce travail est de vérifier cette hypothèse.

Des extractions stéroliques ont été réalisées sur un total de 85 échantillons. Sept espèces végétales ont été considérées (*Aster tripolium*, *Calluna vulgaris*, *Hedera helix*, *Hypochaeris radicata*, *Lythrum salicaria*, *Medicago sativa* et *Salix caprea*). Pour chacune d'elles, nous avons collecté 4 types de matrices (les pelotes d'*Apis mellifera,* espèce généraliste ; les pelotes de *Bombus terrestris,* espèce généraliste ; les charges scopales d'une abeille spécialiste et le pollen de la plante hôte de l'abeille spécialiste). Au sein d'un même modèle, les 4 origines polliniques ont été comparées entre elles à l'aide d'analyses statistiques nMDS et un test de composé indicateur.

Les résultats de ce mémoire nous permettent d'infirmer le postulat de départ d'un ajout systématique d'un stérol dans les pelotes des abeilles généralistes. Ces résultats suggèrent donc que l'adaptation majeure des abeilles polylectiques à la variabilité des stérols des plantes est probablement d'ordre physiologique et pas comportementale. En plus de confirmer l'existence d'une grande variabilité interspécifique dans la composition stérolique des pollens, nos observations soulignent l'importance des stérols à 27 atomes de carbones (cholestérol et cholesténone) pour les espèces de la famille des Melittidae. Cette famille étant très probablement à la base du clade des abeilles, nos résultats tendent à confirmer que la transition entre le régime carnivore des ancêtres des abeilles et le régime phytophage des abeilles actuelles s'est faite en partie par l'utilisation de plantes présentant un pollen riche en stérols dont l'architecture moléculaire est proche du cholestérol. Enfin, nous avons montré qu'au moins une abeille spécialiste semble ajouter des composés stéroliques dans ses charges scopales, ce qui prouve que ce comportement n'est pas propre aux abeilles généralistes.

Mots clefs : Abeille – Polylectisme – Oligolectisme – Pollen – Stérols – Variabilité interspécifique

REMERCIEMENTS

Par ces quelques mots je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Pierre RASMONT pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire de zoologie. Ses enseignements couplés à sa passion et sa pédagogie ont été déterminants dans les choix que j'ai pris au cours de mon cursus universitaire et ont largement contribué à la construction de l'étudiant que je suis aujourd'hui.

J'adresse ensuite mes sincères remerciements au Docteur Denis MICHEZ qui a dirigé ce mémoire. Ses conseils avisés, son expérience et ses compétences scientifiques ont été indispensables à la construction et à la conclusion de ce projet. En plus de m'avoir accordé sa confiance en m'acceptant comme mémorant, il m'a donné le privilège d'exercer la fonction d'élève assistant durant deux années. Bien que modeste fonction, j'ai pris beaucoup de plaisir à l'exercer. Au cours de ces deux années d'assistanat j'ai transmis ce que je savais aux étudiants mais j'ai également appris beaucoup de choses sur moi-même. Je lui en serai toujours reconnaissant.

Je remercie également le Professeur Pierre RASMONT du laboratoire de zoologie de l'Université de Mons, le Professeur Georges LOGNAY du laboratoire de chimie analytique de l'Université de Liège (FuSAGx), le docteur Maryse VANDERPLANCK ainsi que le docteur Nicolas VEREECKEN d'avoir accepté d'être les membres de mon jury.

Vivre pleinement l'aventure humaine que représente également le mémoire de fin d'étude n'est possible qu'en présence de personnes de qualité. En cela je remercie tous les membres du laboratoire de zoologie anciens et nouveaux, professeurs et élèves, que j'ai pu côtoyer durant ces trois dernières années.
Un merci particulier à monsieur Dimitri EVRARD, technicien de qualité, pour sa disponibilité, sa bienveillance et son attention à ce que les étudiants ne manquent de rien. Merci à lui qui, par son écoute et ses encouragements, fait bien plus que son seul travail de technicien.

Parmi les membres du laboratoire de zoologie, il en est un exceptionnel à qui je dois beaucoup et sans qui le présent projet n'aurait certainement pas abouti. Je tiens donc à adresser toute ma gratitude au Docteur Maryse VANDERPLANCK pour m'avoir

supervisé sur ce travail. Sa patience, ses compétences scientifiques, sa pédagogie, sa jovialité, son soutien et son aide m'ont été indispensables.

Je suis également très reconnaissant envers le Professeur Georges LOGNAY ainsi que toute son équipe pour m'avoir accueilli au sein du service de Chimie Analytique de la Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. Je tiens à remercier particulièrement madame Sophie VANCRAENENBROECK et l'Ingénieur Christophe FISCHER pour leur aide précieuse face aux aléas techniques qui vont de paire avec l'utilisation d'un fougueux GC.

Je tiens aussi à remercie le Docteur Nicolas VEREECKEN qui m'a permis d'utiliser ses talents de photographe afin d'illustrer le présent travail.

Un sincère merci à monsieur Albert Michez de m'avoir fourni les ruches d'abeilles utilisées dans ce travail.

Mon entêtement à poursuivre ces études a considérablement allongé mon statut d'étudiant à l'Université de Mons. Un mal pour un bien car j'ai grâce à cela rencontré des personnes qu'il aurait été dommage de ne pas connaître. Merci à toutes ces personnes pour les souvenirs partagés durant les excursions, pendant les travaux pratiques, lors des nombreuses heures de cours ou au cours d'une simple pause de midi. Merci également à Pipoup et Manu pour ces moments de rédaction partagés. Un sincère remerciement à Johnny non seulement pour les nombreuses heures partagées ensemble mais aussi pour la grande aide qu'il m'a fournie en m'accompagnant lors de missions de récolte, parfois riches en frayeurs et en émotions. Ses sturboiseries ont mis beaucoup de bonne humeur dans le service.

A mes parents, ma famille et à tous mes proches, merci pour votre soutien et vos encouragements de tous les jours.

A Angélique, merci pour ta patience, ta compréhension et tes encouragements. Ton amour et ton soutien ont été le meilleur des carburants au moteur de ma motivation.

Table des matières

1. INTRODUCTION 7

1.1. Généralités 7

1.1.1. Les abeilles solitaires 8

1.1.2. Les abeilles sociales 8

1.2. Ressources alimentaires 9

1.2.1. Composition chimique du pollen, généralités 9

1.2.2 Les stérols végétaux 10

1.3. Physiologie des abeilles : le métabolisme stérolique 13

1.4. Amplitude des choix floraux 16

1.4.1. Contraintes liées l'oligolectisme 17

1.4.2. Adaptations liées au polylectisme 18

1.5. Modèles biologiques 20

1.5.1. *Apis mellifera* L. 20

1.5.2. *Bombus terrestris* (L.) 20

1.5.3. *Andrena vaga* (Panzer) et *Salix caprea* L. 21

1.5.4. Groupe de *Colletes succinctus* (Hymenoptera, Colletidae) 23

1.5.4.1. *Colletes halophilus* Verhoeff et *Aster tripolium* L. 23

1.5.4.2. *Colletes succinctus* (L.) et *Calluna vulgaris* Hull. 24

1.5.4.3. *Colletes hederae* Schmidt & Westrich et *Hedera helix* L. 24

1.5.5. *Dasypoda hirtipes* (Fabricus) et *Hypochaeris radicata* L. 27

1.5.6. Groupe de *Melitta leporina* (Hymenoptera, Melittidae) 27

1.5.6.1. *Melitta nigricans* Alfken et *Lythrum salicaria* L. 27

1.5.6.2. *Melitta leporina* (Panzer) et *Medicago sativa* L. 28

1.6. Objectifs 31

2. MATERIEL ET METHODES 32

2.1. Choix des sites de récoltes 32

2.2. Récolte des pollens 32

2.2.1. Le pollen floral 32

2.2.2. Pelotes d'*Apis mellifera* L. 32

2.2.3. Pelotes de *Bombus terrestris* (L.) 33

2.2.4. Pollen récolté par les abeilles spécialistes 33

2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives 36

2.3.1. Préparation et analyse des échantillons 37

2.4. Analyses statistiques 40

2.4.1. Données brutes 40
2.4.2. Analyse de la variance 40
2.4.3. Analyses multivariées 40
2.4.4. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) 40
2.4.5. Analyse multivariée de la variance par test de permutation 41
2.4.6. Analyse des composés indicateurs 41
3. RESULTATS 42
3.1. Palynologie 42
3.2. Analyses stéroliques 42
3.2.1. *Aster tripolium* 42
3.2.2. *Calluna vulgaris* 44
3.2.3. *Hedera helix* 47
3.2.4. *Hypochaeris radicata* 49
3.2.5. *Lyhtrum salicaria* 51
3.2.6. *Medicago sativa* 54
3.2.7. *Salix caprea* 56
3.2.8. Méta-analyse 59
4. DISCUSSION 60
4.1. Variabilité des stérols au sein des pollens floraux 60
4.1.1. Variabilité interspécifique 60
4.1.2. Variabilité intraspécifique 60
4.1.3. Variabilité méthodologique 62
4.2. Modification du pollen floral par les abeilles polylectiques et oligolectiques 63
5. CONCLUSION 65
6. PERSPECTIVES 66
7. BIBLIOGRAPHIE 67
8. ANNEXES 75
8.1. ANNEXES I : biosynthèses des stérols chez les plantes 75
8.2. ANNEXES II : Chromatogrammes représentatifs des échantillons modèles étudiés 77

1. INTRODUCTION

1.1. Généralités

Probablement apparues en Afrique au Crétacé moyen (Michez, 2007; Cardinal & Danforth, 2013), les abeilles comptent actuellement environ 17 000 espèces décrites, réparties en 7 familles, elles-mêmes subdivisées en 1200 genres (Michener, 2007). Ces insectes font partie de la superfamille des Apoïdea qui appartient au groupe des Aculétaes, au sous-ordre des Apocrites et à l'ordre des Hymenoptera. Les abeilles partagent de nombreux caractères dérivés et forment un groupe monophylétique (Michener, 2007; Danforth *et al*., 2006).

Les 7 familles d'Apoïdes sont séparées en deux groupes, les langues longues (familles des Apidae et des Megachilidae) et les langues courtes (familles des Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Melittidae et Stenotritidae) (Danforth *et al.*, 2006) (Fig. 1).

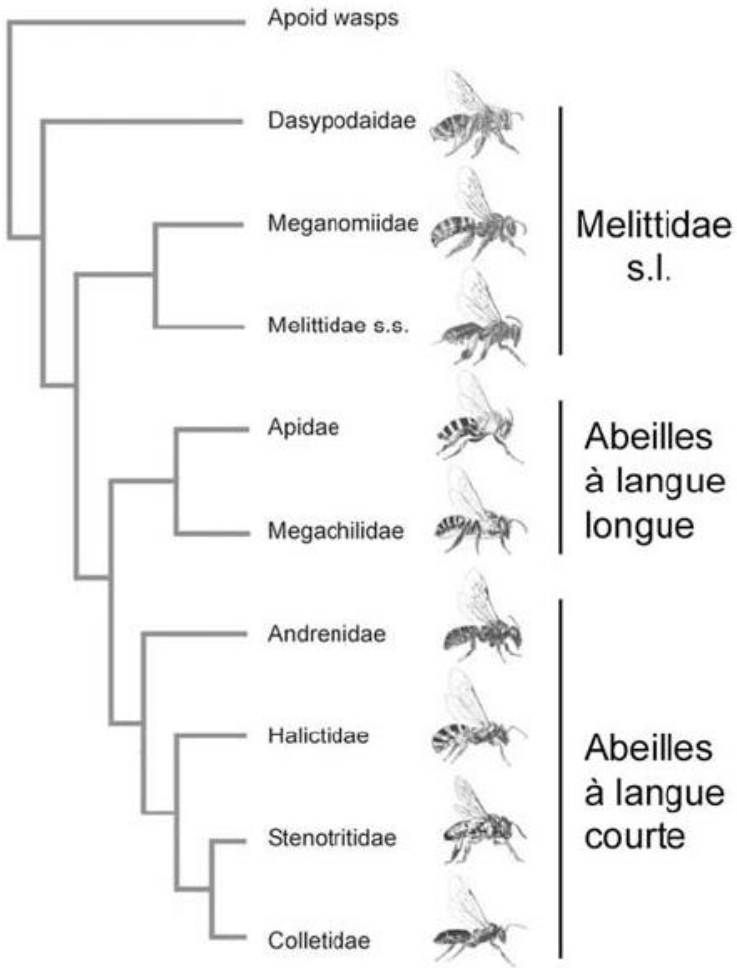


Figure 1: Phylogénie des Apoidea Apiformes basée sur la morphologie des adultes et le séquençage de 5 gènes (d'après Danforth *et al.*, 2006).

La socialité n'est apparue que chez deux familles d'abeilles : les Apidae, dont les espèces sociales représentent 6 % des abeilles (Pouvreau, 2004) et les Halictidae (Danforth *et al*., 2008; Timmermann & Kuhlmann, 2008). L'espèce sociale la plus connue est *Apis mellifera L.* de par son exploitation par l'homme depuis de nombreuses années.

Le mode de vie solitaire est donc prédominant chez ces insectes (Michener, 2007).

1.1.1. Les abeilles solitaires

D'une manière générale le cycle de vie des abeilles solitaires peut être décrit comme suit : au moment de l'émergence des femelles, les mâles sont déjà sortis et patrouillent aux alentours des nids ou de leurs plantes hôtes. A leur sortie, les femelles vierges sont rapidement fécondées (Pouvreau, 2004).

Suite à cet accouplement, les femelles commencent la confection du nid où elles vont accumuler des ressources alimentaires telles que du pollen, du nectar et autres dérivés floraux. Selon les espèces, le nid est construit dans le sol (ex : *Andrena vaga*) (Fig. 2), dans des tiges creuses (ex : *Osmia cornuta*) (Fig. 3) ou encore dans d'anciennes coquilles d'escargot (ex : *Osmia bicolor*) (Pouvreau, 2004).

Dans la majorité des cas, la femelle meurt avant l'émergence de sa progéniture.

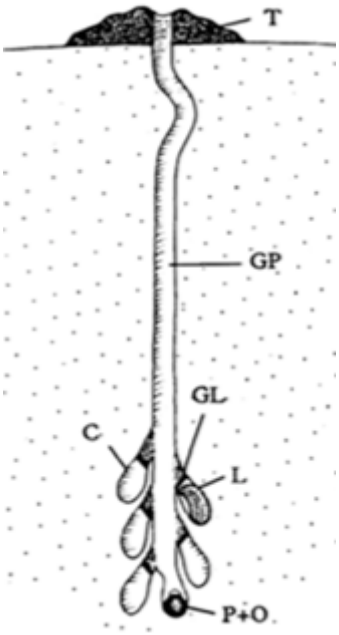


Figure 2: Nid d'*Andrena vaga*. C: cellule; GL: galerie latérale; GP: galerie principale; L: larve; P+O: pain avec un oeuf; T: tumulus (Pouvreau, 2004)

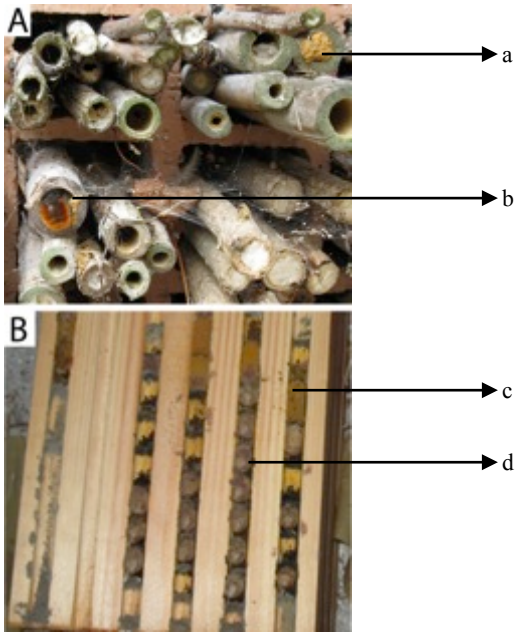


Figure 3: A: Nid d'*Osmia cornuta* en branches. a: bouchon confectionné par une femelle; b: femelle d'*Osmia cornuta*. B: Détail de l'intérieur du nid d'*Osmia cornuta*. c: pain de pollen; d: coccon d'*Osmia cornuta* contenant un adulte (P.-L. Zerck)

1.1.2. Les abeilles sociales

Minoritaires chez les Apoïdes, les abeilles sociales ne se retrouvent que dans les familles des Apidae et des Halictidae (Pouvreau, 2004; Danforth *et al*., 2008; Timmermann & Kuhlmann, 2008). Ces espèces forment des colonies qui consistent en la cohabitation dans un même nid de minimum deux individus (Michener, 2000). Fréquemment, les abeilles constituant une colonie peuvent être divisées en deux groupes : les ouvrières et la reine (Michener, 2000). Ces deux castes sont notamment rencontrées chez les abeilles mellifères et les bourdons.

Les bourdons, pour qui la socialité est catégorisée comme « primitive », ont un cycle de vie différent qui fait passer la reine par un stade solitaire. Chez ce groupe d'abeilles, l'accouplement a lieu avant l'hibernation de la future reine. Lors de son émergence, celle-ci doit alors trouver un nid afin d'y pondre les premiers œufs.

L'altitude ou le climat semble avoir une influence sur la socialité. En effet, chez les Halictidae, certaines espèces (e.g. *Lasioglossum calceatum* (Scopoli)) présentent un comportement social dans les basses altitudes et un comportement solitaire en région

montagneuse. Ce phénomène s'observe aussi chez les bourdons où les seules espèces subalpines constituent des colonies dont le nombre d'individus est très fortement réduit par rapport aux autres espèces telles que *Bombus terrestris*. D'autres espèces (e.g. *Halictus rubicundus*) adoptent un style de vie solitaire dans les climats plus froids et se socialisent dans les climats chauds (Soucy, 2002; Timmermann & Kuhlmann, 2008).

1.2. Ressources alimentaires

Pour les abeilles, la source exclusive de nourriture provient des fleurs : le pollen et le nectar. Elles disposent d'adaptations morphologiques à la collecte du pollen et du nectar telles que la langue et les brosses de récolte (Pouvreau, 2004).

Alors que le nectar va essentiellement fournir des hydrates de carbone (Brodscheider & Crailsheim, 2010), le pollen va majoritairement fournir des protéines, lipides, glucides, matières minérales et vitamines (B, C, E et H) (Pouvreau, 2004; Brodscheider & Crailsheim, 2010). Dans une colonie d'abeilles mellifères, les adultes et les larves dépendent des stocks de pollen et les ouvrières peuvent adapter leur stratégie de récolte afin de subvenir aux besoins en protéines et carbohydrates (Brodscheider & Crailsheim, 2010).

L'interaction entre les plantes et les insectes a longtemps été qualifiée de relation mutualiste. Il a cependant été démontré que certaines espèces d'abeilles sont capables d'extraire des étamines la quasi-totalité du pollen, réduisant ainsi le succès reproducteur de la plante (Westerkamp, 1996; Schlindwein *et al*., 2005). Il existe de ce fait une forte compétition pour le pollen entre l'abeille et la plante qui en dépendent toutes deux pour leur reproduction respective. Les relations plante-abeille ne peuvent dès lors être considérées comme un mutualisme mais cette interaction complexe est plus justement qualifiée d'exploitation mutuelle réciproque au sein de laquelle les deux partenaires s'exploitent l'un l'autre pour leur reproduction en essayant de faire pencher la balance en leur faveur (Westerkamp, 1996). Suite à cette pression sélective, les plantes présentent différentes adaptations permettant de limiter l'accès au pollen, notamment des caractères morphologiques particuliers tels que l'hétéranthérie, la dissimulation du pollen ou la libération progressive du pollen (Schlindwein *et al*., 2005; Thorp, 2000).

Outre ces adaptations morphologiques, la composition chimique du pollen, de par sa toxicité ou sa valeur nutritionnelle, peut également jouer un rôle de protection contre bon nombre d'insectes phytophages et privilégie ainsi le butinage par des insectes spécialisés (Praz *et al*., 2008a; Jürgens & Dötterl, 2004). Certains sucres tels que le mannose, le lactose, le xylose ou le galactose s'avèrent être des composés toxiques pour les abeilles et se retrouvent dans un certain nombre de pollens (Brodscheider & Crailsheim, 2010).

1.2.1. Composition chimique du pollen, généralités

L'analyse chimique du pollen n'est pas aisée à mettre en œuvre de par la difficulté à en obtenir des quantités suffisantes de pollen. Alors que les plantes anémophiles permettent une récolte manuelle aisée du pollen, le pollen de la plupart des plantes entomophiles étudiées a été collecté par *Apis mellifera*. L'analyse de ces différents pollens se fait donc par l'analyse des pelotes. Les abeilles mellifères ajoutant du nectar régurgité à leurs pelotes, les connaissances sur la composition chimique de ces pollens restent incertaines (Roulston & Cane, 2000).

Le pollen est constitué de protéines, d'azote, d'acides aminés, de lipides, de stérols, d'amidon, de sucres, de vitamines, d'acides organiques, d'acides nucléiques, d'enzymes et de pigments en concentration variable (Pouvreau, 2004).Alors que la composition en acides aminés totaux est constante (3,5% à 24,9% de matière sèche pour les acides aminés liés aux protéines), la composition et la teneur en polypeptides (de 2,5% à 61% de matière sèche (Buchmann, 1986)) et en stérols est beaucoup plus variable (Feldlaufer *et al.*, 1993;

Vanderplanck, 2013). Il apparaît cependant que des plantes syntopiques ou phylogénétiquement proches peuvent présenter une composition stérolique relativement similaire (Vanderplanck, 2013).

La valeur nutritive du pollen est couramment estimée par la teneur en protéines brutes (Tasei & Aupine, 2008). Les abeilles semblent préférer un pollen riche en protéines alors que les sucres n'ont que peu d'intérêt sur la nutrition des abeilles (Hügel, 1962). Les protéines étant d'une importance capitale, un apport trop faible affecte la reproduction, la croissance ainsi que la longévité des insectes (Roulston & Cane, 2000). La teneur en protéines n'est cependant pas le seul facteur déterminant la valeur nutritive du pollen. En effet, la balance en acides aminés ainsi que le profil stérolique ont toute leur importance (Westerkamp, 1996; Rasmont *et al*., 2005).De Groot (1953) a déterminé que 10 acides aminés (la thréonine, la valine, la méthionine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, l'histidine, la lysine, l'arginine et le tryptophane) étaient essentiels à *Apis mellifera* et que ceux-ci devaient se trouver en une certaine proportion. La quantité de pollen requise par les abeilles dépend d'ailleurs plus de la composition en acides aminés que de celle en protéines brutes (Nicolson, 2011).

Alors que les protéines et les acides aminés ont fait l'objet d'un grand nombre d'études, peu de choses sont connues sur les stérols.

1.2.2 Les stérols végétaux

Les stérols, lipides insaponifiabes, sont un groupe de stéroïdes caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) sur le carbone C_3 et d'une chaîne aliphatique de 8 à 10 carbones greffée au carbone 17. Le noyau structural est un noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène, autrement appelé noyau stérane, et compte en tout 17 atomes de carbone. Ce noyau se compose de trois cyclohexanes (A, B, C) et d'un cyclopentane (D). Le groupement hydroxyle (a), le noyau tétracyclique (b) et la chaîne latérale (c), forment les trois domaines structuraux des stérols (Fig. 4). Le domaine polaire (a), en opposition avec les deux domaines non polaires (b et c), fait des stérols une molécule amphipatique. La plupart des stérols possèdent également deux groupements méthyles, l'un sur le carbone 10 et l'autre sur le carbone 13. Ces molécules diffèrent entre elles notamment par le nombre et la position des doubles liaisons ainsi que par le type, le nombre et la localisation des groupes fonctionnels. La configuration des substituants et la conformation des cycles est également une source de variabilité au sein de ce groupe de composés (Heldt, 2005; Hopkins, 2003; Vanderplanck *et al*., 2011; Leshninger, 1981).

Chez les plantes, les stérols sont synthétisés de novo par la voie de l'acide mévalonique (Fig. 5). Selon Heldt (2005) et Hopkins (2003), la première étape du processus débute dans le cytosol avec la condensation de trois molécules d'acétylcoenzyme A (A-CoA) et se termine par la formation du mévalonate. Chez les animaux, cette première étape est cruciale pour la régulation de la synthèse des stérols. Il n'a pas encore été établi que la formation du mévalonate a la même importance chez les plantes. Le mévalonate subit ensuite une série de réactions (détail en annexes : *ANNEXE I*) aboutissant notamment à la formation du triterpène précurseur des stérols et des brassinostéroïdes : le squalène.

Le stérol le plus connu est probablement le cholestérol (Fig. 4). Cependant, très peu de plantes le synthétisent. Elles contiennent néanmoins des phytostérols qui présentent, au niveau du carbone 24, un ou deux substituant(s) carboné(s) supplémentaire(s). Les phytostérols les plus courants sont le β-sitostérol (C29), le 24-méthylènecholestérol (C28) et le campestérol (C28) (Fig. 4). Ces stérols sont des ∂5 stérols qui sont les plus courants. Les ∂7 stérols (ex : ∂7-avenastérol. Fig 4) sont quand à eux moins courants (Huang & Grunwald, 1988). A l'heure actuelle, une centaine de stérols ont été identifiés chez les plantes (Hopkins, 2003; Akihisa *et al*., 1991).

Les stérols présents chez les plantes peuvent jouer le rôle de constituants de la membrane cellulaire, d'intermédiaires métaboliques, d'hormones (brassinostéroïdes) ou encore de défense contre les herbivores et champignons (classe des stéroïdes glucosylés) (Heldt, 2005). Certains ecdystéroïdes végétaux tels que la phytoecdysone ressemblent très fortement à l'hormone de mue de certains insectes, mais bloquent le processus de mue et peuvent donc être utilisés comme insecticide (Hopkins, 2003).

Les causes de la variation dans le profil stérolique sont encore inconnues. Le profil stérolique pourrait être une adaptation aux conditions locales abiotiques (Behmer & Nes, 2003) ou encore une adaptation afin de privilégier le butinage des insectes pollinisateurs plutôt que des herbivores ou des voleurs de nectar (Vanderplanck, 2013).

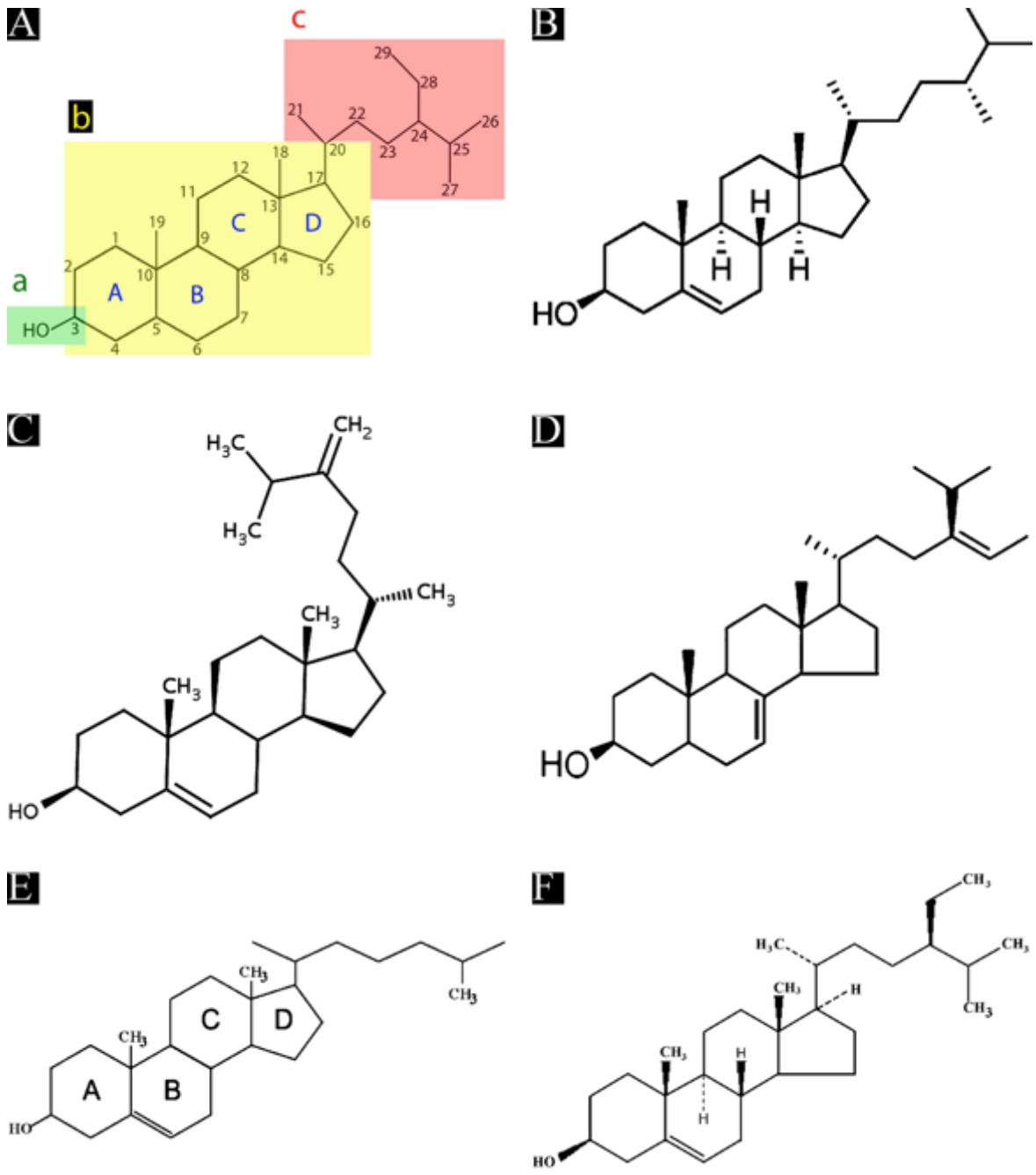


Figure 4. A : Représentation du noyau stérane ainsi que des trois domaines structuraux d'un stérol, d'après Behmer et Nes (2003) (P.-L. Zerck) ; B : Structure du campestérol (J. Thewalt Lab website) ; C : Structure du 24-méthylènecholestérol (http://www.chemicalbook.com; modifié) ; D : Structure du ∂7-avénastérol (http://www.chemfaces.com) ; E : Structure du cholestérol (Vie website, snv.jussieu.fr ; modifié) ; F : Structure du β-sitostérol (nature's method website; modifié)

1.3. Physiologie des abeilles : le métabolisme stérolique

Les stérols, dont le cholestérol, sont d'une importance capitale pour les insectes. En effet, ceux-ci servent (i) de précurseurs pour des hormones stéroïdiennes telles que l'ecdystéroïde (Fig. 5), une hormone de mue, (ii) de molécule de signalisation en se liant aux protéines *Hedgehog* ou (iii) de constituants cellulaires biolipidiques (Heldt, 2005; Nation, 2002).
Cependant, les insectes, contrairement aux vertébrés, sont incapables de synthétiser ces stérols et doivent les puiser d'une source exogène (Clark & Bloch, 1959).

Les insectes se nourrissant de tissus animaux n'ont pas de problème pour trouver une source suffisante en cholestérol. En effet, les tissus animaux disposent généralement d'une forte concentration en cholestérol (Svoboda *et al*., 1978). Cependant, les insectes phytophages font face à une faible quantité de cholestérol dans leur alimentation (Jing *et al*., 2012). Trois stratégies se sont donc démarquées chez ces insectes :

- Certains insectes profitent d'endosymbiontes intestinaux qui leur procurent les stérols nécessaires (Clayton, 1964).

- D'autres insectes phytophages, dont les clades basaux des hyménoptères, désalkylent les phytostérols à 28 ou 29 atomes de carbones en cholestérol (C_{27}), précurseur de l'hormone de mue, grâce à des voies métaboliques très différentes et encore peu connues (Svoboda *et al*., 1978; Behmer & Nes, 2003; Grieneisen *et al*., 1993) (Fig. 6).

- Les insectes ne pouvant pas désalkyler les phytostérols utilisent un phytostérol en C_{28} ou C_{29} comme précurseur de leur hormone de mue qui est également différente avec 28 ou 29 atomes de carbone. C'est par exemple le cas de l'abeille mellifère qui convertit du campestérol (C_{28}) en makistérone A (C_{28} ; 20-hydroxy-24-α-méthylecdysone) (Fig. 5) qui sera son hormone de mue à la place de l'ecdysone (C_{27}) (Fig. 5) (Svoboda *et al*., 2003).

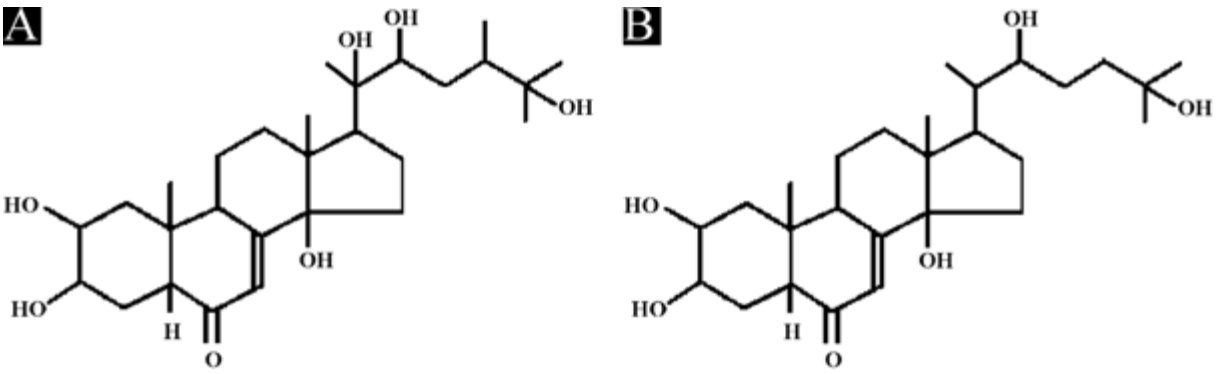


Fig 5. A : Structure du makistérone A (d'après Svoboda, 1991 ; modifié) ; B : Structure de l'ecdysone (d'après Svoboda, 1991 ; modifié)

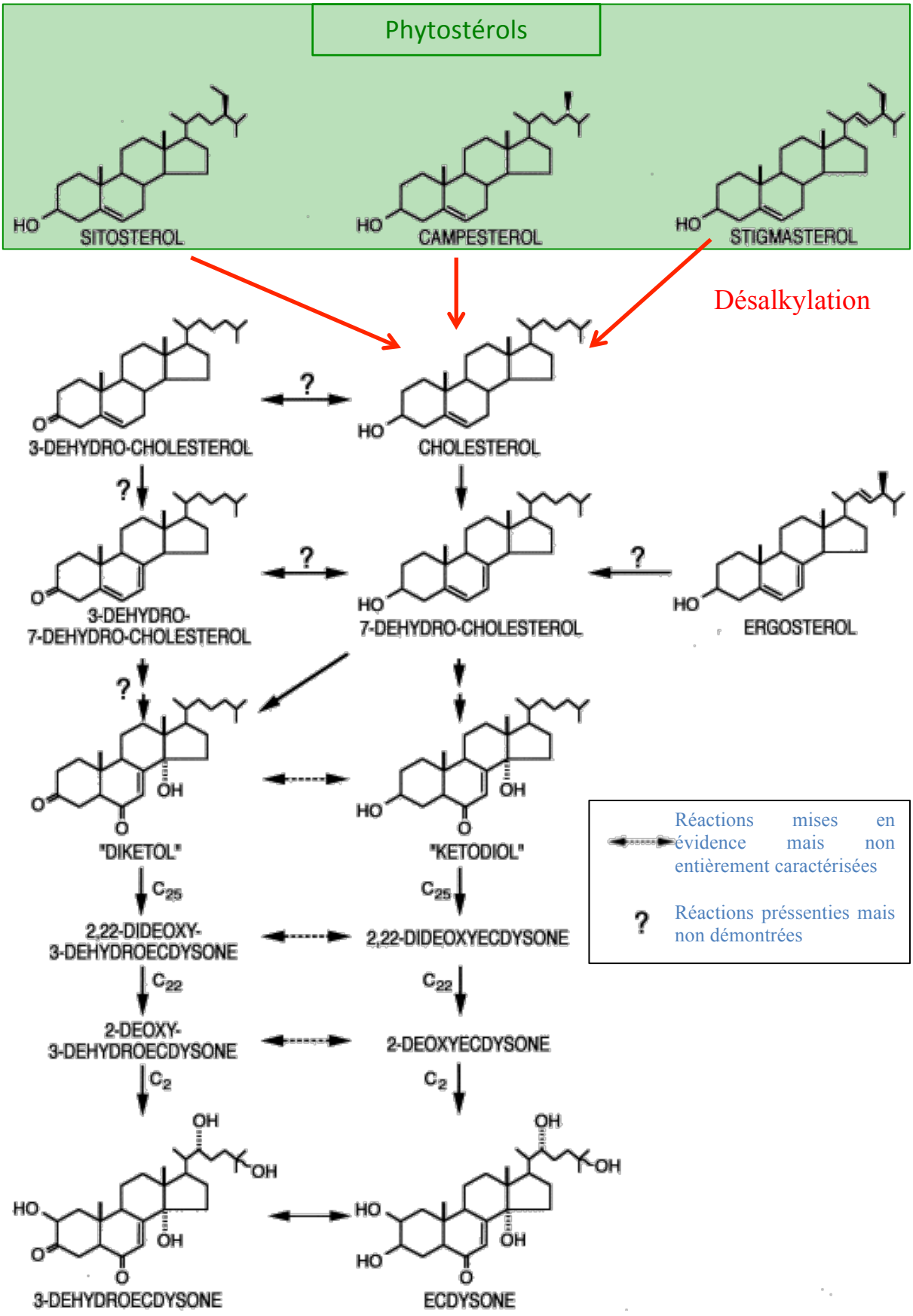


Fig. 6 : Schéma de la biosynthèse des ecdystéroïdes effectives chez les clades basaux d'Hyménoptères phytophages. Les phytostérols sont d'origines alimentaires et sont désalkylés en cholestérol. D'après Grienseisen *et al*., 1993 (modifié ; P.-L. Zerck).

Les besoins quantitatifs en stérols sont variables d'un insecte à l'autre. Certaines espèces n'ont besoin que de 0,01% (*Musca vicina*) alors qu'une concentration dix fois supérieure est requise chez d'autres espèces (*Blattella germanica*) (Clayton, 1964).

La question de la détection des stérols chez les insectes a surtout été explorée chez la sauterelle et montre que ces insectes sont capables de détecter les stérols grâce à un feedback post-ingestion. Cette capacité serait couplée à une mémoire associative qui lie la détection des stérols au goût de l'aliment ingéré (Behmer & Nes, 2003).

Il semblerait que le lieu majeur d'absorption des stérols se fasse au niveau du jabot. Le mode de transport de ces molécules reste cependant inconnu. Les cassettes à liason d'ATP (ABC : ATP Binding Cassete) ont été évoqués pour la régulation de l'efflux des stérols chez *Drosophila* alors que ces transporteurs sont généralement imputés au transport des pigments chez les insectes (Jing *et al*., 2012).

Chez *Helicoverpa zea*, les stérols introduits dans la diète ont un impact significatif sur la durée de développement de l'insecte, le succès de l'éclosion et sur les gènes exprimés dans le jabot (Jing *et al*., 2012).

Tous les insectes ne savent pas exploiter tous les stérols présents dans leur nutrition. Certains phytostérols ont un effet barrière. Ceci est rencontré chez la sauterelle *Schistocerca americana* qui est vulnérable au spinastérol, un stérol d'ailleurs absent de son alimentation (Behmer & Elias, 1999).

Chez l'abeille mellifère, le stérol tissulaire majeur est le 24-méthylènecholestérol. C'est également le stérol majeur du couvain (Svoboda *et al*., 1983). Cette importante concentration en 24-méthylènecholestérol résulte d'un transfert sélectif de stérol depuis les sources endogènes de l'imago jusqu'à la nourriture des larves (Svoboda *et al*., 1986). Il semblerait que ce transfert se fasse par l'intermédiaire des glandes hypopharyngiales, mandibulaires et/ou du jabot. Ces différents tissus et organes ne montrent pourtant aucune accumulation de 24-méthylènecholestérol (Svoboda *et al*., 1986). La même étude de Svoboda (1986) montre que le pourcentage de 24-méthylènecholestérol est plus important dans la gelée royale que dans le pollen. Elle montre également que la teneur en campestérol reste stable du pollen à la gelée royale alors que la concentration en sitostérol et isofucostérol diminue.

La plupart des études sur le métabolisme stérolique des abeilles ont été effectuées sur *Apis mellifera*. Les données sur les autres espèces d'abeilles sont encore lacunaires. Il semble cependant que la capacité à désalkyler les phytostérols ait été perdue chez les Apocrites en général (Behmer & Nes, 2003) et que trouver de nouvelles sources de stérols ait été une des contraintes majeures lors du passage de la diète carnivore au régime phytophage (Dötterl & Vereecken, 2010).

Il semble cependant que certains phytostérols ont un rôle à jouer dans le choix floral des abeilles. Ils sont en partie responsables du pouvoir attractif qu'exercent des extraits lipidiques polliniques envers les abeilles (Hügel, 1962). Il semble également que certains stérols aient un effet répulsif sur *Apis mellifera* alors que le même pollen peut être parfaitement utilisé par *Bombus terrestris* (Rasmont *et al*., 2005). Un abeille généraliste est donc soumise à certaines contraintes liées à son métabolisme stérolique et ne pourra pas butiner certaines plantes. Le métabolisme stérolique des abeilles oligolectiques les oblige, avec une certaine plasticité, à récolter du pollen sur des plantes présentant un certain profil stérolique (Vanderplanck, 2013).

1.4. Amplitude des choix floraux

La relation entre les plantes et les insectes est d'une importance capitale, ceci tant pour l'abeille que pour la plante. Le pollen et le nectar étant les sources exclusives de nutriments, l'abeille a besoin de la plante pour se nourrir et pour trouver les ressources nécessaires au développement de sa progéniture (Dötterl *et al*., 2005). La plante, quant à elle, bénéficie du transport de pollen effectué par les insectes, ce qui permet un important brassage génétique et une pollinisation plus rapide. En conséquence de cette étroite relation, l'essor des Angiospermes va être très fortement corrélé à celui des Apoïdes et de nombreux cas de coévolution vont être rencontrés.

Trois comportements alimentaires peuvent être rencontrés : le polylectisme, l'oligolectisme et le monolectisme (Roberson, 1925; Müller & Kuhlmann, 2008) (*Table I*). Ces trois termes font référence à la diversité des plantes visitées. Les abeilles polylectiques ou généralistes visitent plusieurs taxons floraux distants phylogénétiquement. L'oligolectisme, quant à lui, désigne un régime alimentaire qui se compose d'un nombre restreint de taxons proches phylogénétiquement, appartenant généralement à la même famille ou au même genre. Le monolectisme est un cas extrême où l'abeille est spécialisée sur une seule espèce de plante.

Table I **:** Catégories selon la gamme de plantes butinées par l'abeille utilisées dans l'étude de 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 plante.

Il est parfois nécessaire de prendre du recul avec ces définitions. En effet, dans certains cas, une abeille peut être considérée comme oligolectique strict car ne récoltant du pollen que sur une seule espèce de plante, mais peut également être plus généraliste pour la récolte du nectar et autres dérivés floraux si plusieurs espèces de plantes sont visitées à cet effet. C'est par exemple le cas de *Macropis europaea* qui ne récolte du pollen que sur *Lysimachia vulgaris* (Michez & Patiny, 2005).

Une dernière notion est à distinguer du type de diète : la fidélité. Cette dernière rend compte du comportement des visiteurs lors du butinage (Pouvreau, 2004). *Apis mellifera*, par exemple, est une abeille généraliste mais fidèle. Cette fidélité est une spécialisation temporaire et locale sur une ressource (Pouvreau, 2004).

1.4.1. Contraintes liées l'oligolectisme

L'oligolectisme engendre diverses contraintes. Ces dernières peuvent être morphologiques, comportementales, physiologiques ou encore phénologiques. Les avantages de l'oligolectisme restent d'ailleurs largement inconnus (Weiner *et al*., 2010).

Les caractéristiques morphologiques sélectionnées au cours de l'évolution des abeilles spécialistes sont celles facilitant l'accès et le transport des ressources florales. La longueur de la langue est une première caractéristique, les courtes langues étant plus adaptées à des tubes de corolle courts. La pilosité des pattes est également un élément important facilitant et augmentant la capacité de transport du pollen (Pouvreau, 2004). La longueur des pattes, dans certains cas, est un avantage indéniable dans la récolte d'huile. Ce cas particulier est rencontré dans le genre *Rediviva* (Melittidae), abeilles oligolectiques sur les Scrophulariaceae et les Orchidiaceae. Sur ces pattes, des soies spécifiques permettent de collecter l'huile par capillarité, l'huile est ensuite mélangée à la charge pollinique (Steiner & Whitehead, 1990; Steiner & Whitehead, 1991).

Les adaptations éthologiques permettent d'accroître la rapidité de récolte de ces insectes. Cette rapidité de récolte pourrait offrir un avantage sélectif par rapport aux autres abeilles visitant la même fleur (Pouvreau, 2004).

La majorité des plantes visitées par les abeilles spécialistes étant également visitées par les abeilles polylectiques, la spécialisation comportementale ne réduit que faiblement la compétition interspécifique (Minckley & Roulston, 2006). A l'inverse, la spécialisation sur une plante dont le pollen comporte des composés toxiques permettrait une compétition interspécifique beaucoup plus faible.

Seule source d'azote, il semble évident que la composition en acides aminés et plus généralement la valeur nutritive du pollen soit un élément clef des choix floraux des abeilles. Une plante dont le pollen est peu nutritif, pauvre en acides aminés essentiels, sera probablement moins visitée pour son pollen qu'une plante produisant du pollen plus riche. La capacité à dégrader plus efficacement les composés polliniques permet également la réduction de la compétition interspécifique. Il a d'ailleurs été montré que les abeilles oligolectiques sont capables de dégrader plus efficacement, grâce à une meilleure digestion, les composés présents en faible quantité dans le pollen de leur plante hôte (Strickler, 1979; Weiner *et al*., 2010). Cette adaptation est telle que le développement larvaire est compromis lorsque l'abeille récolte une plante qui n'est pas sa plante hôte (Praz *et al*., 2008a). Les abeilles spécialistes résistent également généralement mieux aux composés toxiques de leur plante hôte et leurs larves sont capables de se développer sur du pollen inexploitable par la plupart des abeilles généralistes (Ali & Agrawal, 2012; Sedivy *et al*., 2011).

La phénologie de l'abeille spécialiste doit impérativement être en phase avec la floraison de sa plante hôte (Michez *et al*., 2008). En outre, pour certaines espèces d'abeilles, il apparaît que la synchronisation entre l'émergence de l'abeille et la floraison de sa plante hôte, ainsi que la fidélité de l'insecte, seraient les premiers responsables de la spécialisation, plutôt qu'une morphologie particulière (Michez *et al*., 2008).

Ce genre d'adaptation se remarque également de manière journalière. En effet, les voyages de collectes de l'abeille s'effectuent préférentiellement au moment où la plante hôte offre le plus de pollen ou le plus de nectar (Eickwort & Ginsberg, 1980).

1.4.2. Adaptations liées au polylectisme

Les informations concernant les adaptations au régime alimentaire généraliste sont encore peu abondantes à l'heure actuelle. La majeure partie des ouvrages se centre plutôt sur les adaptations liées à l'oligolectisme de par les nombreuses et intrigantes questions se reportant à ce type de régime alimentaire.

En termes de disponibilité de ressources florales, une espèce généraliste serait, dans certaines conditions, plus avantagée qu'une espèce spécialiste étant donné qu'elle ne dépend pas d'une gamme de plantes hôtes limitée (Eickwort & Ginsberg, 1980). Si une plante disparaît, l'abeille généraliste peut passer à la récolte d'une autre plante. Pour une abeille spécialiste, si sa plante hôte disparaît, l'abeille disparaît elle aussi.

Les abeilles généralistes ont la capacité de digérer les pollens comportant peu de toxines et/ou de qualité nutritive suffisante. Elles ne sont par ailleurs pas capables de se développer sur du pollen à qualité nutritive trop basse ou comportant trop de toxines (Sedivy *et al*., 2011). Il est cependant intéressant de constater que les abeilles généralistes semblent posséder une plasticité physiologique intraspécifique dans l'utilisation des nutriments polliniques. Ceci a été montré chez *Osmia cornuta* où toutes les larves ont vu leur croissance échouer sur du pollen de *Rannunculus* sauf deux d'entre elles qui sont arrivées à maturité (Sedivy *et al*., 2011). Cette plasticité, toujours selon Sedivy *et al.* (2011), leur permettrait d'inclure de nouvelles plantes dans leur diète.

Le métabolisme stérolique semble être un élément clef dans le comportement polylectique. Diverses études ont montré chez certaines espèces polylectiques (*Apis mellifera*, *Bombus terrestris*) une différence entre la composition stérolique du pollen récolté sur les pattes d'abeilles et celle du pollen récolté sur la ressource visitée (Rasmont *et al*., 2005; Svoboda *et al*., 1986; Loper *et al*., 1980). En effet, la composition chimique de la charge pollinique est modifiée par l'abeille par l'ajout de nectar ainsi que de sécrétions glandulaires (Winston, 1987; Roulston, 2005). Par ailleurs, cette différence n'a pas été rencontrée chez *Andrena vaga*, abeille solitaire oligolectique (Vanderplanck, 2009).

L'utilisation du nectar pour humecter le pollen est un comportement qui n'est généralement pas rencontré chez les abeilles solitaires (Pouvreau, 2004) sauf pour certaines Melittidae ou/et Panurginae (Andrenidae) (Thorp, 2000). Les différents composés ajoutés (nectar, miel, sécrétions glandulaires) s'accompagnent de divers enzymes et microorganismes provenant du nectar lui-même ou du jabot de l'insecte (Anderson *et al*., 2011). Chez les espèces mouillant le pollen, la collecte est donc suivie d'une cascade biochimique avec la fermentation lactique des sucres pour principale réaction (Winston, 1987; Roulston, 2005). La fermentation commence sur la patte d'abeille et se termine au sein du nid, environ deux semaines plus tard. Le pH du pain de pollen est alors descendu à 4 (Loper *et al*., 1980). Divers auteurs ont identifié un composé stérolique dans les pelotes de pollen d'*Apis mellifera*, le 24-méthylènecholestérol (Pain & Maugenet, 1966; Barbier, 1966; Hügel, 1965; Loper *et al*., 1980).

La spécialisation alimentaire pourrait dériver d'une incapacité à reconnaître et à manipuler plusieurs plantes hôtes. Cette limitation neurologique serait d'ailleurs un facteur plus important dans le processus de spécialisation alimentaire que la qualité du pollen (Bernays, 2001). De même, certaines preuves tendent à montrer que la reconnaissance de la plante hôte se ferait sur base génétique (Praz *et al*., 2008b). Dès lors, la capacité

d'apprentissage d'un insecte serait primordiale dans le comportement généraliste des abeilles. Cette dernière est associée aux corps pédonculés qui sont particulièrement développés chez les abeilles (Medioni & Robert, 1969). Deux types d'apprentissages se distinguent : l'apprentissage latent et l'apprentissage associatif. Le premier sert dans l'orientation et le langage alors que le deuxième permet des associations entre des odeurs, couleurs et formes de plantes (Bernard, 2007).

Laloi *et al.* (2000) ont montré que la mémorisation était plus importante chez les ouvrières âgées de plus de 12 jours (période à laquelle elles deviennent butineuses). Chez ce groupe d'abeilles, la réponse à un stimulus olfactif est moins rapide que chez les jeunes ouvrières, mais la résistance à l'extinction est beaucoup plus importante.

La mémoire associative des abeilles et bourdons leur permet d'associer une ressource à une odeur, couleur ou morphologie florale. Cette association est parfois très rapide, *Apis mellifera* n'a besoin que de trois à cinq visites pour distinguer une morphologie qui donne ou non une ressource (Goulson, 1999). En plus de cette association fleur-ressource, l'insecte associe la morphologie florale à un comportement de butinage. Ainsi un individu disposera d'un pattern de comportements et adoptera l'un d'entre eux en fonction de la fleur butinée. Le signal peut se modifier au cours du temps, en fonction des fleurs visitées et des ressources dont elles disposent. Ces différents signaux guident leurs choix ainsi que leur comportement de récolte face à une morphologie florale particulière. Une association « perdue » pourra également être rapidement recouvrée si les différents signaux permettent à nouveau l'obtention de pollen, nectar ou huile (Goulson, 2010).

1.5. Modèles biologiques

Le *Tableau II* résume les caractéristiques des modèles biologiques étudiés.

Tabeau II : modèles biologiques utilisés au cours de ce travail

Abeilles	Socialités	Familles	Diètes	Plantes hôtes
Apis mellifera	Eusociale	Apidae	Polylectique	-
Bombus terrestris	Sociale	Apidae	Polylectique	-
Andrena vaga	Solitaire	Andrenidae	Oligolectique	*Salix caprea* (Salicaceae)
Colletes halophilus	Solitaire	Colletidae	Oligolectique	*Aster tripolium* (Asteraceae)
Colletes hederae	Solitaire	Colletidae	Polylectique à forte préférence	*Hedera helix* (Araliaceae)
Colletes succinctus	Solitaire	Colletidae	Polylectique à forte préférence	*Calluna vulgaris* (Ericaceae)
Dasypoda hirtipes	Solitaire	Melittidae	Oligolectique	*Hypochaeris radicata* L. (Asteraceae)
Melitta leporina	Solitaire	Melittidae	monolectique	*Medicago sativa* (Fabaceae)
Melitta nigricans	Solitaire	Melittidae	monolectique	*Lythrum salicaria* (Lythraceae)

1.5.1. *Apis mellifera* L.

L'abeille mellifère (Fig. 8) a été domestiquée par l'homme depuis de nombreuses années. De par son utilisation dans l'apiculture, sa distribution est presque mondiale. Sa période de vol s'étend de mars à octobre-novembre (Pain & Maugenet, 1966). Espèce eusociale, les colonies qu'elle forme peuvent atteindre 80 000 individus répartis en plusieurs castes (Bellmann, 1999). Les fonctions des ouvrières varient au cours du temps. Elles commencent leur vie en tant que « nettoyeuses » et finissent comme « butineuses » en passant par un stade de « bâtisseuses » (Bellmann, 1999).

Cette espèce transporte le pollen sous forme de pelotes stockées sur les pattes postérieures. L'abeille mellifère est une abeille fidèle. Cette caractéristique se traduit par la confection de pelotes de pollen pures (constituées de pollen unifloral) (Leonhardt & Blüthgen, 2012).

1.5.2. *Bombus terrestris* (L.)

Le bourdon terrestre (Fig. 8) forme également des colonies mais la socialité y est qualifiée d'eusociale primitive de par l'existence d'une phase solitaire au cours du cycle de vie (Michener, 1974). Les colonies sont également plus petites (jusqu'à 600 individus). Sa période de vol s'étend de mars à octobre (Bellmann, 1999). Sa distribution est ouest-

paléarctique centrée sur la Méditerranée et s'étend au Nord jusqu'à Helsinki et à l'Est jusqu'à l'Altaï (Rasmont *et al*., 2008). Cette espèce de bourdon a la particularité de nicher sous terre, préférentiellement dans les anciens terriers de petits mammifères (Pouvreau, 2004). Morphologiquement cette espèce se distingue par une pilosité en partie noire, une bande jaune à l'avant du thorax et sur le deuxième segment abdominal ainsi que deux bandes blanches à l'extrémité de l'abdomen (Bellmann, 1999).

La composition pollinique des pelotes de ce bourdon est hétérogène (Fig. 9). Contrairement à l'abeille domestique, *Bombus terrestris* n'est pas une espèce fidèle bien qu'un faible degré de fidélité soit remarqué (Somme *et al*., *in prep.*; Leonhardt & Blüthgen, 2012). Moerman (2011, données non publiées) a analysé les pelotes de pollen de *Bombus terrestris* et a constaté que le β-sitostérol y était en plus grande quantité que dans les pelotes d'*Apis mellifera* provenant d'une même ressource florale. Cette différence a également été remarquée par Rasmont *et al.* (2005).

1.5.3. *Andrena vaga* (Panzer) et *Salix caprea* L.

Andrena vaga (Fig. 8) fait partie de la famille des Andrenidae. Cette abeille solitaire est une espèce univoltine psammophile qui se nourrit exclusivement sur les plantes du genre *Salix* (Bischoff *et al*., 2003; Vanderplanck *et al*., 2009). Elle se distingue morphologiquement par une couleur noire, un abdomen brillant alors que les poils de la tête et du thorax sont gris pâle (Bellmann, 1999).

L'andrène vague est largement répandue en Europe septentrionale et continentale. Au niveau mondial elle se rencontre dans toute la région paléarctique (Bischoff *et al*., 2003) (Fig 7). Espèce protandre, elle est une des premières abeilles à émerger au mois de mars et vole jusqu'au mois de mai. Son émergence est en concordance avec la floraison de sa plante hôte, le saule (Salicaceae, *Salix*) (Vanderplanck *et al*., 2009; Vereecken *et al*., 2006).

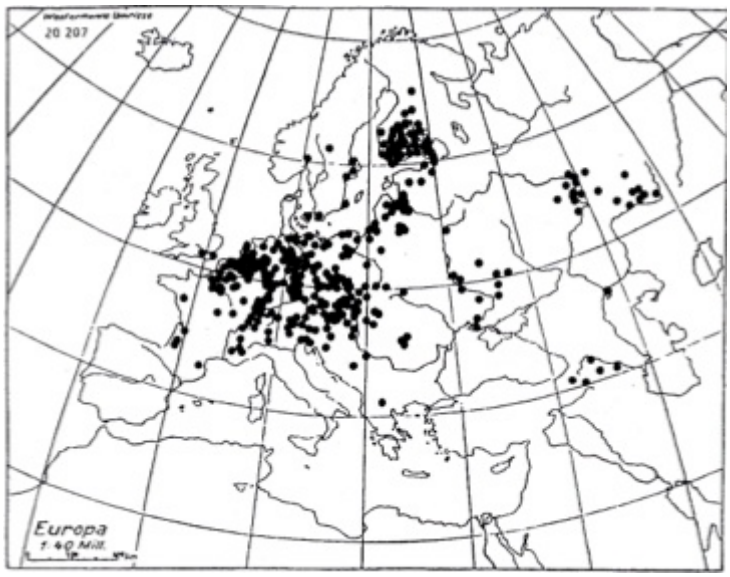


Figure 7: Distribution mondiale d'*Andrena vaga* d'après (Gusenleitner & Schwarz, 2002)

Salix caprea (Fig. 8) est un arbre de la famille des Salicaceae. Le mode de pollinisation de cet arbre est, en regard de la morphologie florale, plutôt de type anémophile. Cependant, de nombreux insectes semblent apprécier son pollen ainsi que son nectar de par leur facilité d'accès (Michener, 2007).

La composition chimique du pollen de *Salix caprea* est caractérisée par une richesse en β-sistérol (24,89%) et en ∂5-arvénastérol (21,56%). Elle est cependant faible en 24-méthylènecholestérol (3,12%) et contient, au total, 12 mg/g de stérols (Vanderplanck, 2009).

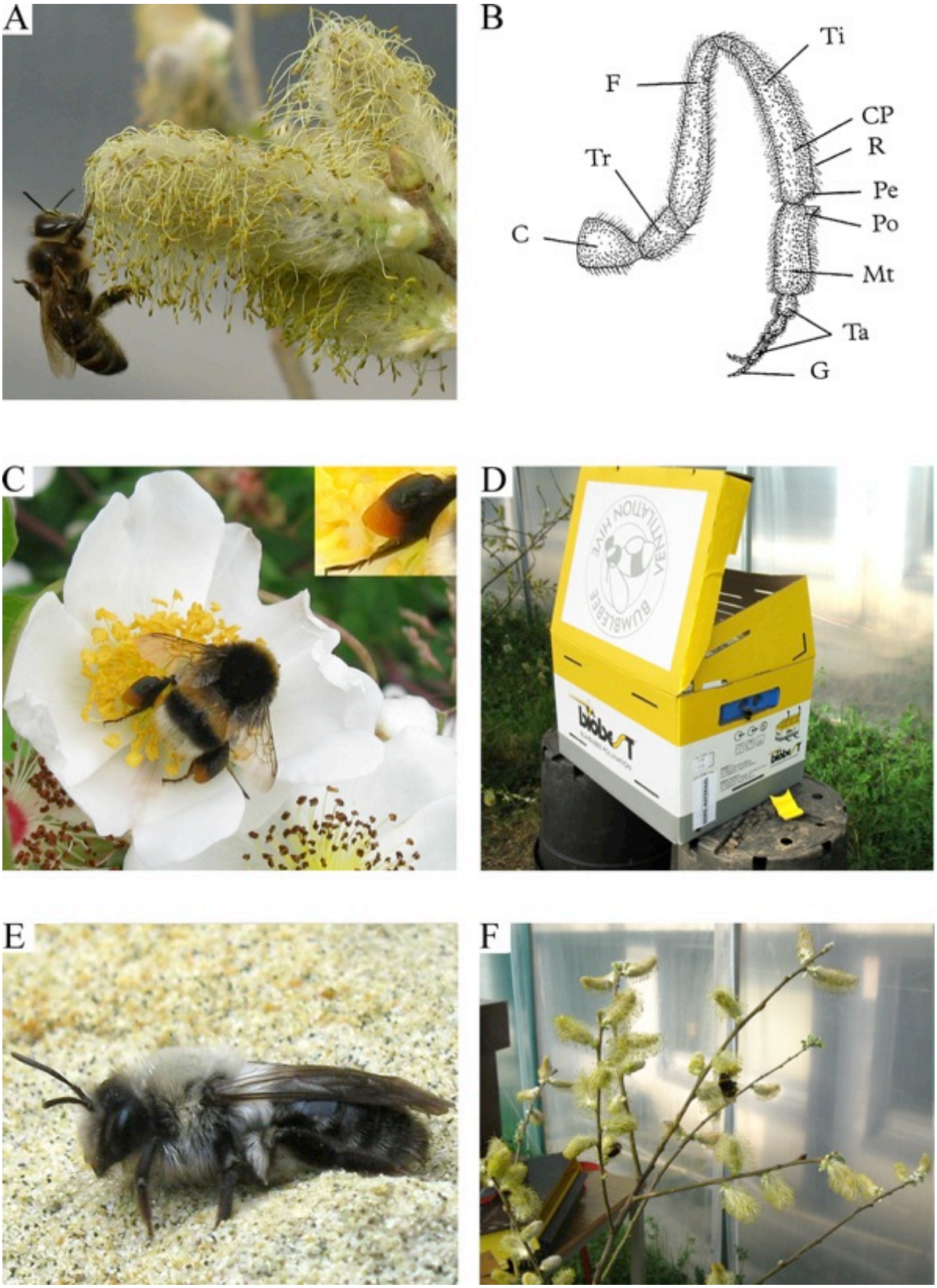


Figure 9. A : *Apis mellifera* sur *Salix caprea* (P.-L. Zerck) ; **B :** face antérieure d'une patte postérieure d'*Apis mellifera* : C : coxa ; CP : corbeille à pollen ; F : fémur ; G : griffe ; Mt : métatarse ; Pe : peigne à pollen ; Po : poussoir à pollen ; R : rateau ; Ta : tarse ; Ti : tibia ; Tr : trochanter (d'après Pouvreau, 2004); **C :** *Bombus terrestris* sur *Rosa canina* (P.-L. Zerck) ; **D :** Ruche industrielle de *Bombus terrestris* (Biobest) (P.-L. Zerck) ; **E :** femelle d'*Andrena vaga* (P.-L. Zerck) ; **F :** Rameaux de *Salix caprea* (P.-L. Zerck)

1.5.4. Groupe de *Colletes succinctus* (Hymenoptera, Colletidae)

Les 3 espèces de Colletidae étudiées dans le présent travail sont trois abeilles sœurs, morphologiquement très similaires, appartenant à un groupe de 14 espèces de Colletidae, le groupe de *Colletes succinctus* (Kuhlmann, 2011). Elles sont toutes solitaires.

Les Colletidae sont connues pour avoir la particularité de recouvrir leurs cellules larvaires d'une couche de cellophane (Almeida, 2008) (Fig. 12). Cette caractéristique serait d'ailleurs une synapomorphie de la famille (Michener, 2000). La pellicule semble être composée de sécrétions issues de la glande de Dufour, elle-même associée avec l'appareil venimeux (Almeida, 2008).

1.5.4.1. *Colletes halophilus* Verhoeff et *Aster tripolium* L.

Colletes halophilus (Fig. 12) est inféodée aux marais salants et nidifie sur différents types de substrats (Knowles, 2011). Cette espèce est surtout connue dans les régions les plus septentrionales (E/S-E des côtes anglaises, côtes belges de la Manche et de la Mer du Nord, côtes néerlandaises). De récentes études ont également confirmé sa présence en France (Genoud & Dittlo, 2007). Sa période d'émergence s'étend de mi-août à début novembre (Kuhlmann *et al*., 2007).

Cette espèce est spécialisée sur les Asteraceae et plus particulièrement sur *Aster tripolium* qui est son hôte de prédilection (Müller & Kuhlmann, 2008; Genoud & Dittlo, 2007).

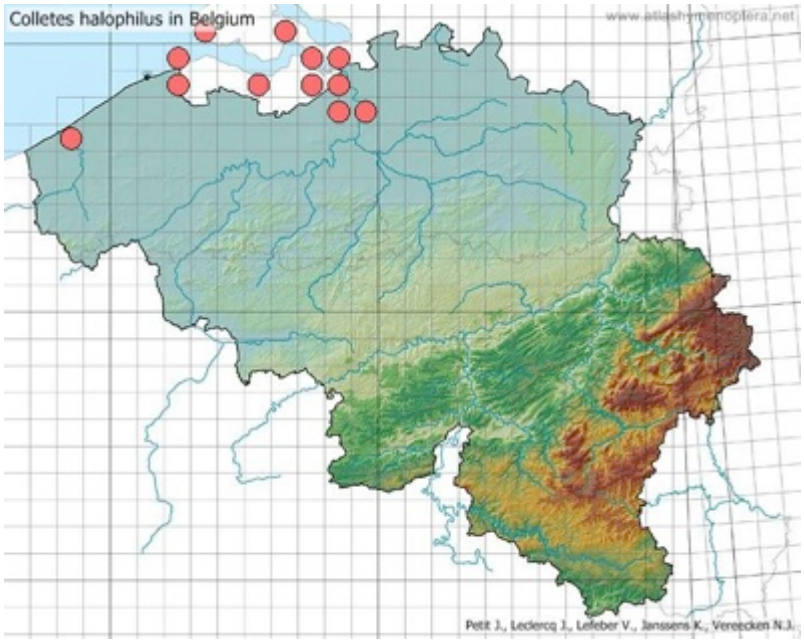


Figure 9: Distribution belge de *Colletes halophilus* (auteurs: Petit J., Leclercq J., Lefeber V., Janssens K., Vereecken N.J. www.atlashymenoptera.net)

Aster tripolium (Fig. 12) est une plante herbacée de la famille des Asteraceae. C'est une espèce halophile typiquement rencontrée dans les marais salés ou en bord de mer (Lambion *et al*., 2004).

La composition stérolique de son pollen est caractérisée par un haut niveau en ∂7-stigmastérol et ∂7-avénastérol est particulièrement élevée (respectivement 13,93mg/g et 9,18m/g) par rapport à ce qui est rencontré chez d'autres plantes. L'ensemble 24-méthylène cholestérol/campestérol n'est quand à lui que de 6,86mg/g. La teneur total en stérol est de 31,2mg/g (matière lyophilisée) (Vanderplanck, *in prep.*).

1.5.4.2. *Colletes succinctus* (L.) et *Calluna vulgaris* Hull.

Colletes succinctus (Fig. 12) est inféodée aux landes et est oligolectique sur *Calluna vulgaris* ainsi que sur les Ericaceae du genre *Erica*. Il a toutefois été constaté que cette espèce pouvait occasionnellement visiter deses Asteraceae et du lierre, qui sont les plantes hôtes de ses espèces sœurs *Colletes halophilus* et *Colletes hederae*, ainsi que des Apiaceae (Müller & Kuhlmann, 2008). Espèce univoltine, elle émerge en mi-juillet et vole jusqu'au début du mois d'octobre (Kuhlmann *et al*., 2007).

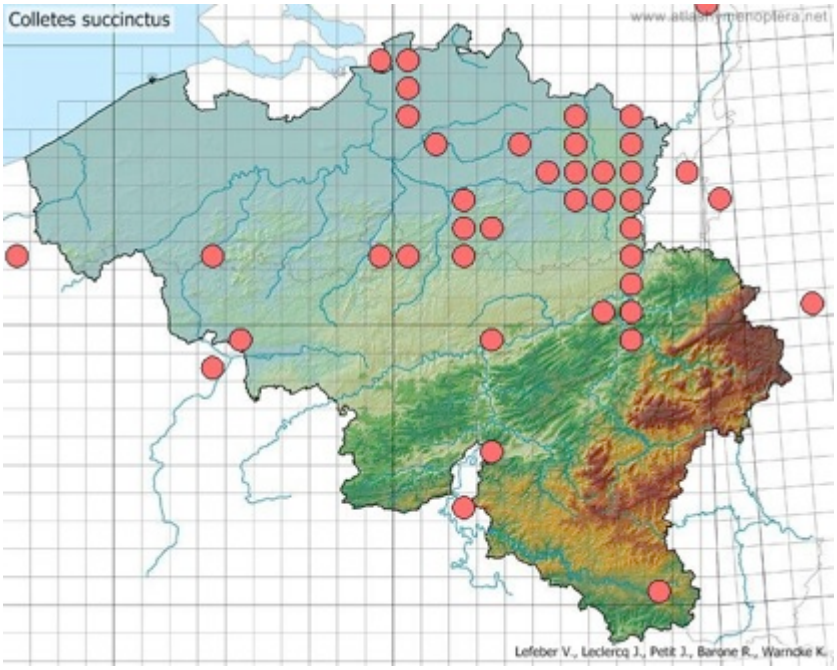


Figure 10: Distribution belge de *Colletes succinctus* (auteurs: Lefeber V., Leclercq J., Petit J., Barone R., Warncke K. . www.atlashymenoptera.net)

Calluna vulgaris (Fig. 12), autrement appelée bruyère commune, est un arbrisseau vivace de la famille des Ericaceae. Cette plante, seule représentante du genre *Calluna* en Belgique, est typique des landes. Elle est également rencontrée dans les pinèdes et les tourbières (Lambion *et al*., 2004).

Les principaux stérols composant le pollen de *Calluna vulgaris* sont le ∂5-avenastérol (8,92mg/g) et le ß-sitostérol (13,88mg/g) (Vanderplanck, *in prep.*).

1.5.4.3. *Colletes hederae* Schmidt & Westrich et *Hedera helix* L.

Colletes hederae (Fig. 12) se distingue par sa plante hôte, *Hedera helix,* dont elle tire son épithète spécifique (Schmidt & Westrich, 1993). Abeille solitaire univoltine, elle émerge à la mi-août et vole jusque fin octobre. Son aire de répartition semble s'établir sur toute l'Europe jusque l'extrême sud de la Péninsule ibérique et avec une limite septentrionale au-delà de la ligne rejoignant l'estuaire de Bristol et celui de la Tamise en Angleterre (Vereecken *et al*., 2009) (Fig. 11).

Différentes études ont démontré que cette espèce n'est pas strictement monolectique sur le lierre, *Hedera helix*. Elle visiterait d'autres plantes telles que des *Odontites* (Scrophulariaceae), des *Calluna* (Ericaceae) et Cichorioidae (Müller & Kuhlmann, 2008).

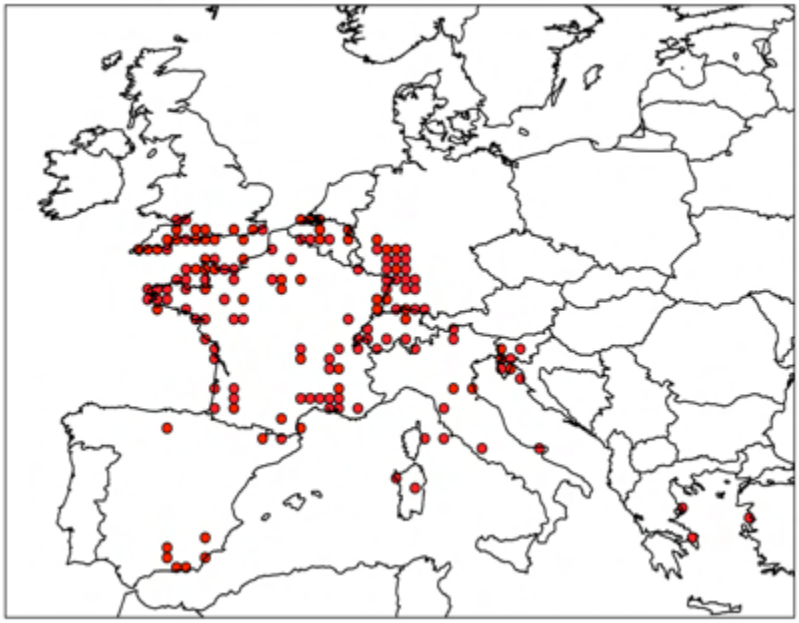


Figure 11: Mise à jour de la distribution des observations de *Colletes hederae* (Vereecken *et al.*, 2009)

Le lierre grimpant (*Hedera helix*) (Fig. 12) est une des quelques lianes de Belgique. Sa floraison s'établit de septembre à octobre. Son aire de répartition est assez vaste en Europe et en Asie occidentale d'où il est originaire. Cette plante s'adapte bien à plusieurs types de milieux et de climats mais ne supporte pas les grands froids (Lambion *et al.*, 2004).

Tout comme l'*Aster tripolium*, le lierre grimpant se caractérise par une forte teneur en ∂7-stigmastérol (7,81mg/g) et en ß-sitostérol (5,97mg/g) (Vanderplanck, *in prep.*).

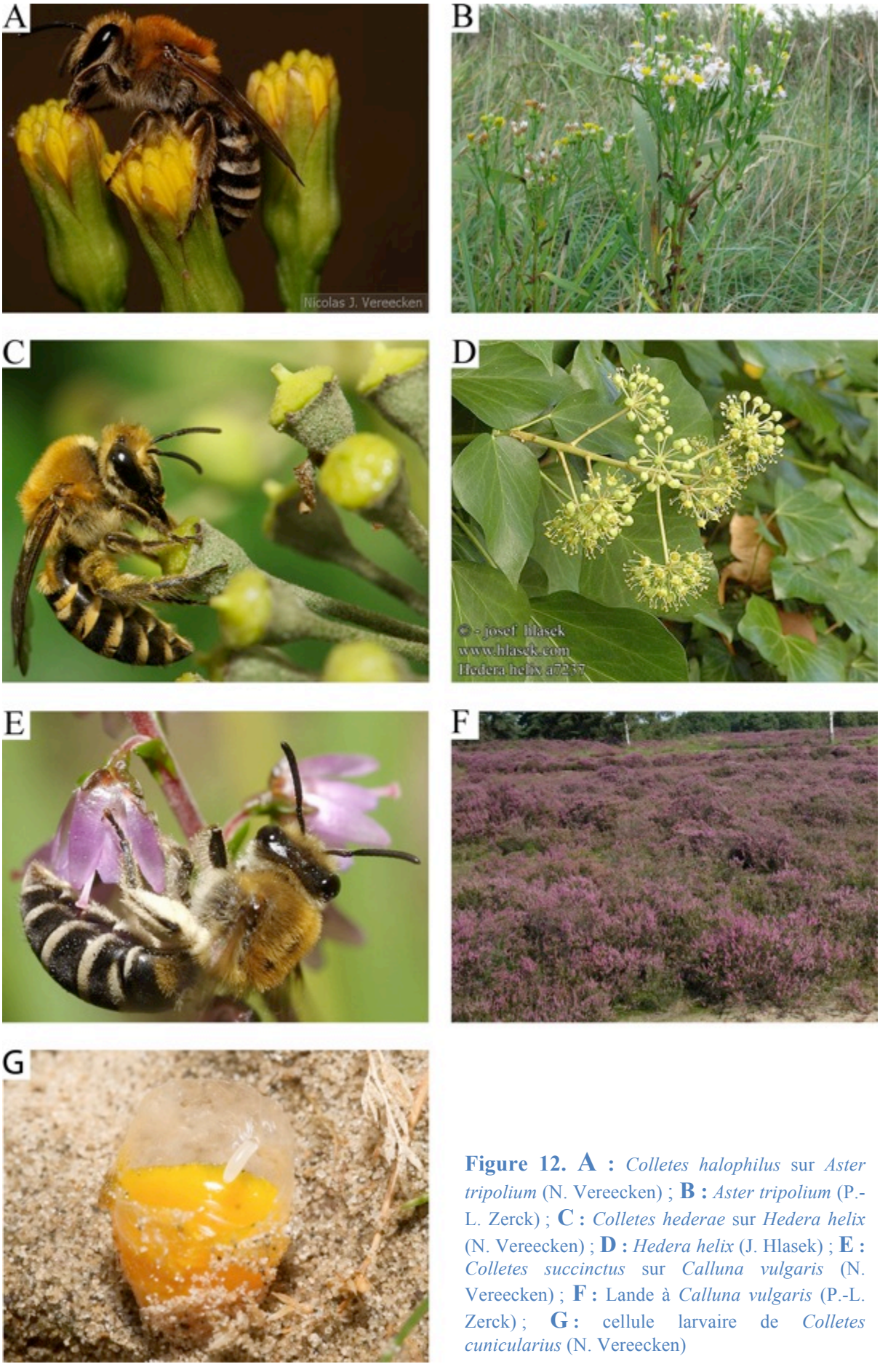


Figure 12. A : *Colletes halophilus* sur *Aster tripolium* (N. Vereecken) ; **B :** *Aster tripolium* (P.-L. Zerck) ; **C :** *Colletes hederae* sur *Hedera helix* (N. Vereecken) ; **D :** *Hedera helix* (J. Hlasek) ; **E :** *Colletes succinctus* sur *Calluna vulgaris* (N. Vereecken) ; **F :** Lande à *Calluna vulgaris* (P.-L. Zerck) ; **G :** cellule larvaire de *Colletes cunicularius* (N. Vereecken)

1.5.5. *Dasypoda hirtipes* (Fabricus) et *Hypochaeris radicata* L.

Dasypoda hirtipes (Fig. 16) est une abeille solitaire univoltine de la famille des Melittidae distinguable morphologiquement par la présence de remarquables brosses de récoltes sur les pattes postérieures des femelles (Michez *et al*., 2004). Elle est surtout rencontrée au bord de chemins sablonneux (Bellmann, 1999).C'est l'abeille du genre Dasypoda la plus commune dans l'ouest paléarctique (Michez, 2002). Elle est abondante dans toute l'Europe, jusqu'en Finlande où elle dépasse le 60ème parallèle tandis qu'elle est rare au Maroc. Elle est citée en Chine par Wu (1978) et dans les montagnes Baïkal, au sud de la Mongolie par Radoszkowski (1887) (Michez *et al*., 2004).

Cette espèce vole de juillet à septembre et est spécialisée sur les Asteraceae (99% de la charge scopale) (Michez *et all*., 2008) et plus particulièrement sur les Asteraceae ligulées telles que les *Hieracium* ou *Picris hieracioides* (Bellmann, 1999).

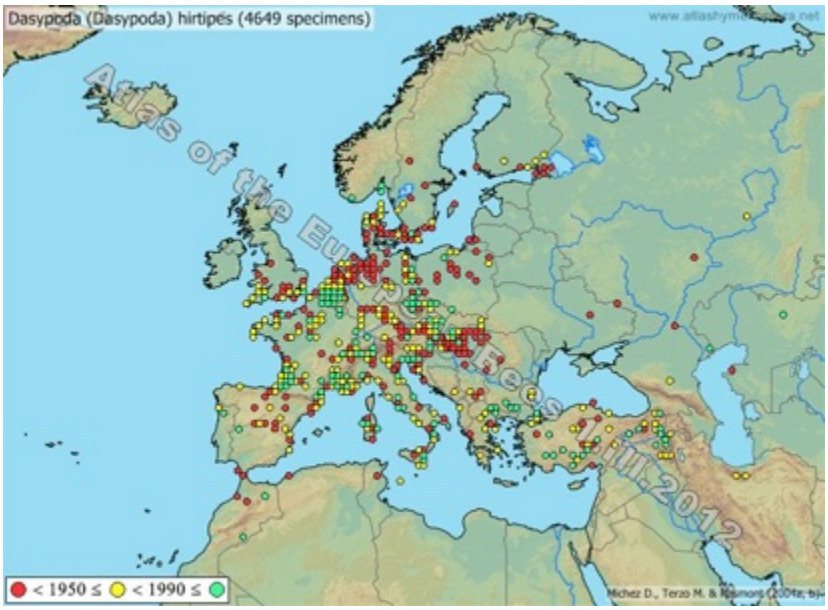


Figure 13: Distribution de *Dasypoda hirtipes* (auteurs: Michez D., Terzo M. & Rasmont P. (2004a, b). www.atlashymenoptera.net)

La plante hôte étudiée dans le cadre de ce travail est *Hypochaeris radicata* (Fig. 16). La porcelle enracinée est surtout rencontrée sur les sols siliceux. Sa distribution s'étend en Europe, Asie Mineure, Afrique du Nord et Macaronésie (Lambion *et al*., 2004). Le pollen de cette plante est très riche en cholestérol (90%) (Barbier, 1966). Cependant, très peu d'informations sont disponibles concernant la composition chimique de ce pollen.

1.5.6. Groupe de *Melitta leporina* (Hymenoptera, Melittidae)

Beaucoup d'espèces dans le genre *Melitta* (famille des Melittidae) sont oligolectiques sur diverses familles de plantes (Michez *et al*., 2008). Les deux espèces de *Melitta* étudiées dans ce travail sont deux abeilles solitaires oligolectiques appartenant au groupe de *Melitta leporina* qui comprend 6 espèces (Michez & Eardley, 2007). Ces deux espèces forment avec *Melitta tricincta* un groupe de trois abeilles sœurs morphologiquement très similaires (Michez *et al*., 2009).

1.5.6.1. *Melitta nigricans* Alfken et *Lythrum salicaria* L.

Melitta nigricans (Fig. 16) est une abeille solitaire et univoltine de la famille des Melittidae. Sa diète est exclusivement constituée de plantes du genre *Lythrum* (Michez *et al*.,

2008). Son habitat, les prairies et friches humides, est inhabituel pour une abeille mais correspond au biotope de sa plante hôte, la salicaire (Michez *et al*., 2008; Michez & Eardley, 2007). La biologie de cette espèce est encore très mal connue. Sa période de vol correspond à la floraison de sa plante hôte, de début juillet à début septembre (Michez & Eardley, 2007; Michez *et al*., 2008).
Cette espèce est assez répandue en Europe (Michez & Eardley, 2007).

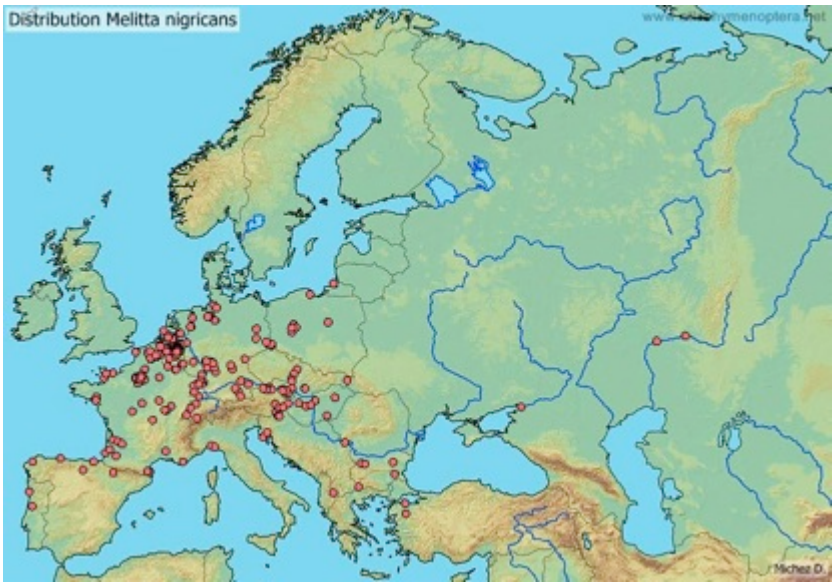


Figure 14: Distribution de *Melitta nigricans* (auteur: Michez D. www.atlashymenoptera.net)

Lythrum salicaria (Fig. 16) est une plante herbacée de la famille des Lyhtraceae. Sa période de floraison s'étend de juin à août en Belgique (Lambion *et al*., 2004). Elle présente une polymorphie de ses grains de pollen, notamment concernant la taille qui varie selon la taille des étamines (Michez *et al*., 2008). Les longues étamines présentent un pollen vert, caractéristique, tandis que les étamines plus courtes offrent un pollen jaune.

Le pollen de cette plante est caractérisé par une forte teneur en 24 méthylènechlestérol+campestérol, ß-sitostérol et ∂5-avénastérol (respectivement 27,94mg/g, 25,78mg/g et 24,23mg/g). La présence de cholesténone (13,05mg/g) est également à souligner, cette concentration étant nettement supérieure à celles rencontrées chez *Aster tripolium*, *Calluna vulgaris*, *Hedera helix* et *Medicago sativa* (Vanderplanck, *in prep.*).

1.5.6.2. *Melitta leporina* (Panzer) et *Medicago sativa* L.

Melitta leporina (Fig. 16) est univoltine et oligolectique sur Fabaceae, plus particulièrement sur *Medicago sativa* (Westrich, 1989). *Melitta leporina* a été particulièrement étudiée pour le remplacement d'*Apis mellifera* dans les cultures de luzerne (*Medicago sativa*). En effet l'abeille domestique semble avoir un faible rendement de pollinisation sur cette plante (Tirgari, 1968). Trouver un pollinisateur remplaçant plus performant procurerait un avantage économique. Son aire de distribution s'établit dans la zone paléarctique. Elle est très répandue en Europe depuis 41°N jusqu'au Sud de la Suisse et en Finlande. Elle est également présente en Asie depuis l'Anatolie et l'Iran jusqu'à Mongolie (Michez & Eardley, 2007). Sa période de vol s'étend de juin jusqu'au mois d'août (Michez & Eardley, 2007).

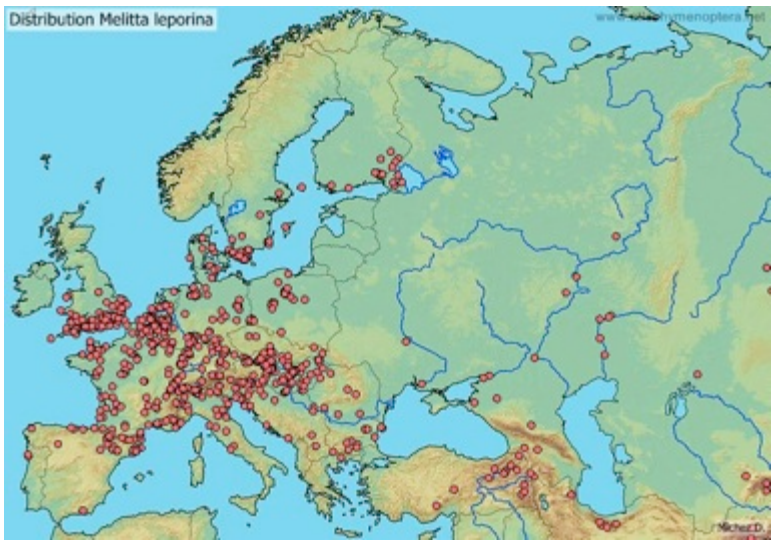


Figure 15: Distribution de *Melitta leporina* (auteur: Michez D. www.atlashymenoptera.net)

Medicago sativa (Fig. 16) est une plante herbacée de la famille des Fabaceae. Anciennement utilisée pour la rotation des cultures comme plante fourragère (Lambion *et al*., 2004), la luzerne refait son apparition notamment dans les fermes bio. Elle est également utilisée pour nourrir le bétail.

La composition stérolique du pollen de luzerne est caractérisée par une forte concentration en ∂7-stigmastérol (47,58mg/g). Les deux autres stérols remarquables de ce pollen sont le ß-sitostérol (9,03mg/g) et le ∂7-avénastérol (8,65mg/g) (Vanderplanck, *in prep.*).

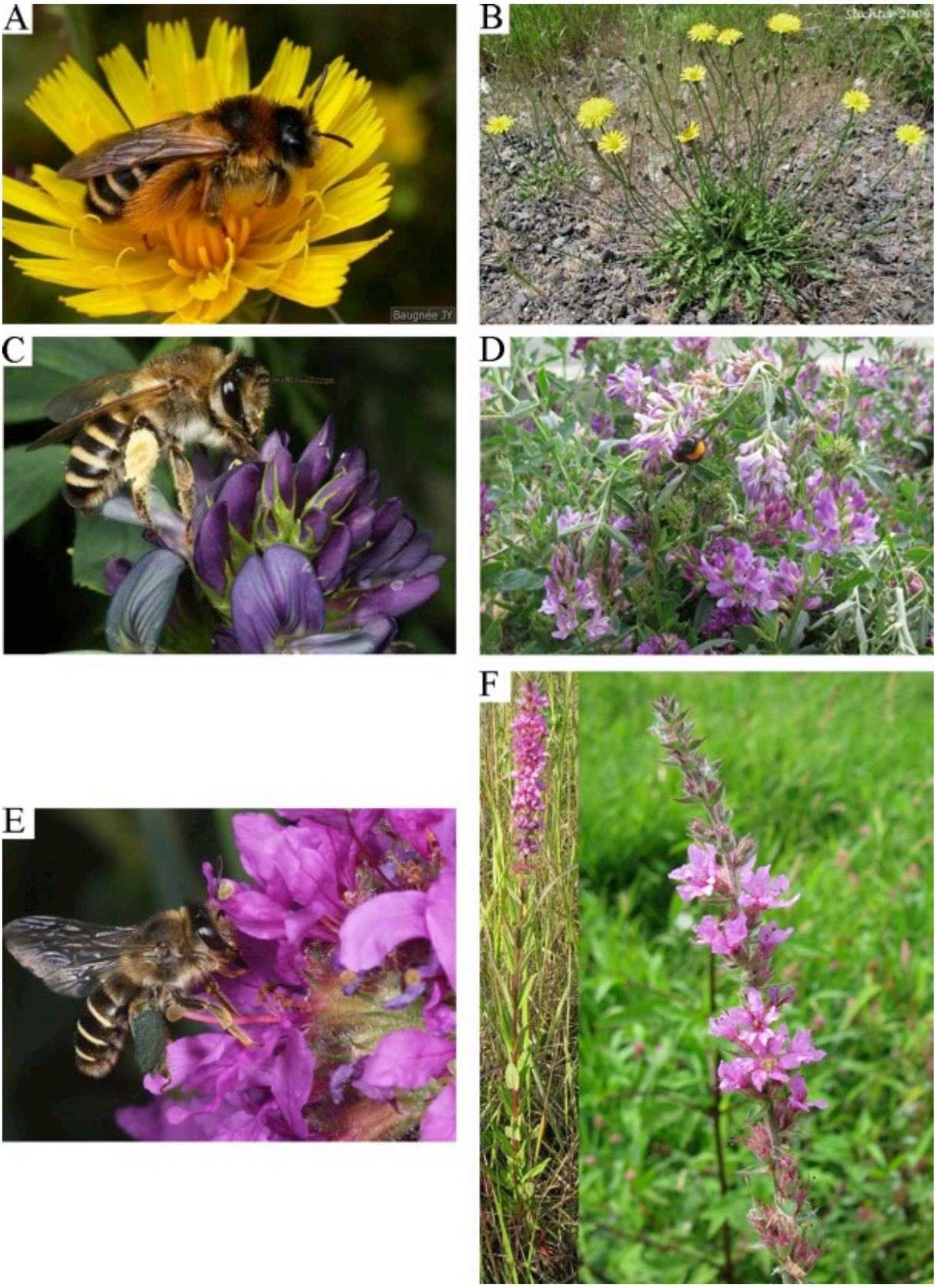


Figure 16. A : *Dasypoda hirtipes* sur *Picris hieracioides* (JY Baugnée) ; **B :** *Hypochaeris radicata* (P. Slichter) ; **C :** *Melitta leporina* (Bernard Jacobi) ; **D :** *Medicago sativa* (P.-L. Zerck) ; **E :** *Melitta nigricans* (Bernhard Jacobi) ; **F :** *Lythrum salicaria* (P.-L. Zerck)

1.6. Objectifs

Cette étude porte sur différentes espèces d'abeilles spécialistes susmentionnées (*Andrena vaga* ; *Colletes halophilus* ; *C. hederae* ; *C. succinctus* ; *Dasypoda hirtipes*; *M. leporina* ; *M. nigricans*) et sur leurs plantes hôtes principales respectives (*Salix caprea* ; *Aster tripolium* ; *Hedera helix* ; *Calluna vulgaris* ; *Hypochaeris radicata* ; *Medicago sativa* ; *Lythrum salicaria*) ainsi que sur deux espèces d'abeilles généralistes, à savoir *Apis mellifera* et *Bombus terrestris terrestris*.

L'objectif principal du présent travail est de déterminer si le polylectisme se caractérise par l'ajout d'un composé stérolique lors de la collecte de pollen par les femelles.

Pour ce faire, les compositions stéroliques des charges polliniques de différentes espèces d'abeilles généralistes et spécialistes ainsi que des pollens floraux correspondant (collecte manuelle) seront analysées et comparées. Les comparaisons se feront entre pollens d'une même origine florale.

Notre hypothèse est que les abeilles généralistes sont capables d'exploiter différents pollens, et donc différents phytostérols, grâce à l'ajout de stérols internes dans leurs pelotes pendant la récolte de pollen. Les abeilles spécialistes étant adaptées à leur plante hôte, ne devraient pas montrer ce comportement.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Choix des sites de récoltes

Les stations de récolte ont été sélectionnées suivant trois critères.

Premièrement, le site devait contenir un nombre suffisamment élevé d'individus de la plante d'intérêt pour pouvoir récolter le pollen floral, les pelotes de pollen de bourdons et d'abeilles mellifères.

Deuxièmement, il fallait que l'abeille spécialiste étudiée soit présente sur le dit site. De cette manière, l'origine du pollen reste identique pour tous les modèles étudiés sur cette plante, évitant ainsi le biais dû à une potentielle variation géographique de la composition stérolique du pollen. Les abeilles spécialistes étant souvent sacrifiées afin de récolter plus efficacement les charges scopales, la taille de la population locale devait également être suffisamment grande pour que le prélèvement de quelques spécimens ne cause pas dommage.

Troisièmement, il était préférable que la densité de la plante étudiée soit nettement supérieure à la densité des autres plantes présentes. Ce critère permet de minimiser les contaminations dans le cas où l'abeille spécialiste étudiée n'est pas strictement spécialisée sur la plante hôte considérée. Une forte concentration permet également de faciliter le triage des pelotes de pollen d'*Apis mellifera* dans le cas où la ruche est placée sur le terrain.

Les différentes stations de récoltes sont présentées dans le tableau III.

2.2. Récolte des pollens

Le pollen utilisé pour la comparaison des spectres stéroliques provient de 4 origines différentes. La première source est le pollen prélevé directement sur la fleur. Les trois autres pollens analysés sont les pelotes de *Bombus terrestris*, d'*Apis mellifera* et les charges scopales des abeilles solitaires

Une fois le pollen récolté dans un tube eppendorf, il est pesé, lyophilisé et conservé au congélateur (-25°C).

Un minimum de 60 mg de pollen est requis pour mener à bien l'extraction stérolique en triplicat (20 mg par analyse) (Vanderplanck *et al*., 2011).

2.2.1. Le pollen floral

L'utilisation d'un diapason est la méthode la plus rapide et la plus efficace. Pour ce faire, les étamines doivent être dégagées du périanthe si ce dernier empêche une récupération optimale du pollen. Le diapason, après avoir été frappé, est mis au contact des étamines qui, en vibrant, perdent leur pollen. Le pollen est récupéré dans un verre de montre.

Afin d'éviter toute contamination, le pollen est observé sous binoculaire et débarrassé des impuretés telles que des anthères ou petits insectes.

2.2.2. Pelotes d'*Apis mellifera* L.

La ruche employée dans le cadre de cette étude provient d'un apiculteur privé (Michez A.).

Une trappe à pollen est employée pour la récupération des pelotes de pollen (Fig. 17). Cette dernière permet le passage de l'abeille mais l'espace accordé est trop étroit et empêche le passage de l'abeille avec ses pelotes. Les pelotes de pollen se détachent alors des pattes postérieures de l'abeille et tombent dans un bac de récupération (Fig. 17). La trappe à pollen doit être vidée tous les soirs et le pollen congelé afin d'éviter une trop forte humidité et le développement de microorganismes tels que les moisissures.

La fidélité d'*Apis mellifera* permet d'obtenir des pelotes monoflorales (Leonhardt & Blüthgen, 2012).

Lorsque la densité de plante est trop faible, rendant alors difficile le tri des pelotes de pollen récoltées, ou que les pelotes d'intérêt ne peuvent être séparées des autres par leur couleur, les ouvrières sont collectées directement sur la fleur et placées dans un tube de contention pour prélever les pelotes (Fig. 17).

2.2.3. Pelotes de *Bombus terrestris* (L.)

Les colonies employées dans le cadre de cette étude sont d'origine commerciale (Fig. 9) et proviennent de la firme Biobest.

Bombus terrestris étant une abeille polylectique non fidèle (Leonhardt & Blüthgen, 2012), il est essentiel de travailler en serre afin d'obtenir des pelotes monoflorales. La plante étudiée est placée dans la serre en même temps que la colonie de bourdon. Les ouvrières portant des pelotes sont attrapées et maintenues dans un tube de contention qui permet l'immobilisation de l'animal durant la récupération des pelotes au moyen d'un cure-dents.

2.2.4. Pollen récolté par les abeilles spécialistes

L'abeille est enfermée vivante dans un tube eppendorf percé d'un trou durant quelques minutes. L'abeille, en s'agitant et en se frottant le corps, va faire tomber son pollen dans le fond du tube. Cette méthode évite de tuer l'abeille, ce qui présente un avantage lorsque les populations sont assez petites.

Lorsque la population est assez grande ou que la localisation de la station ne permet pas des missions de récolte répétées, les tubes sont ramenés au laboratoire et placés dans un congélateur. Le pollen est alors récupéré en grattant le corps de l'insecte à l'aide d'une spatule.

Chez certaines espèces d'abeilles (e.g. *Melitta leporina*), les charges polliniques sont disposées de manière compacte sur les pattes postérieures. Il est alors possible d'employer un tube de contention.

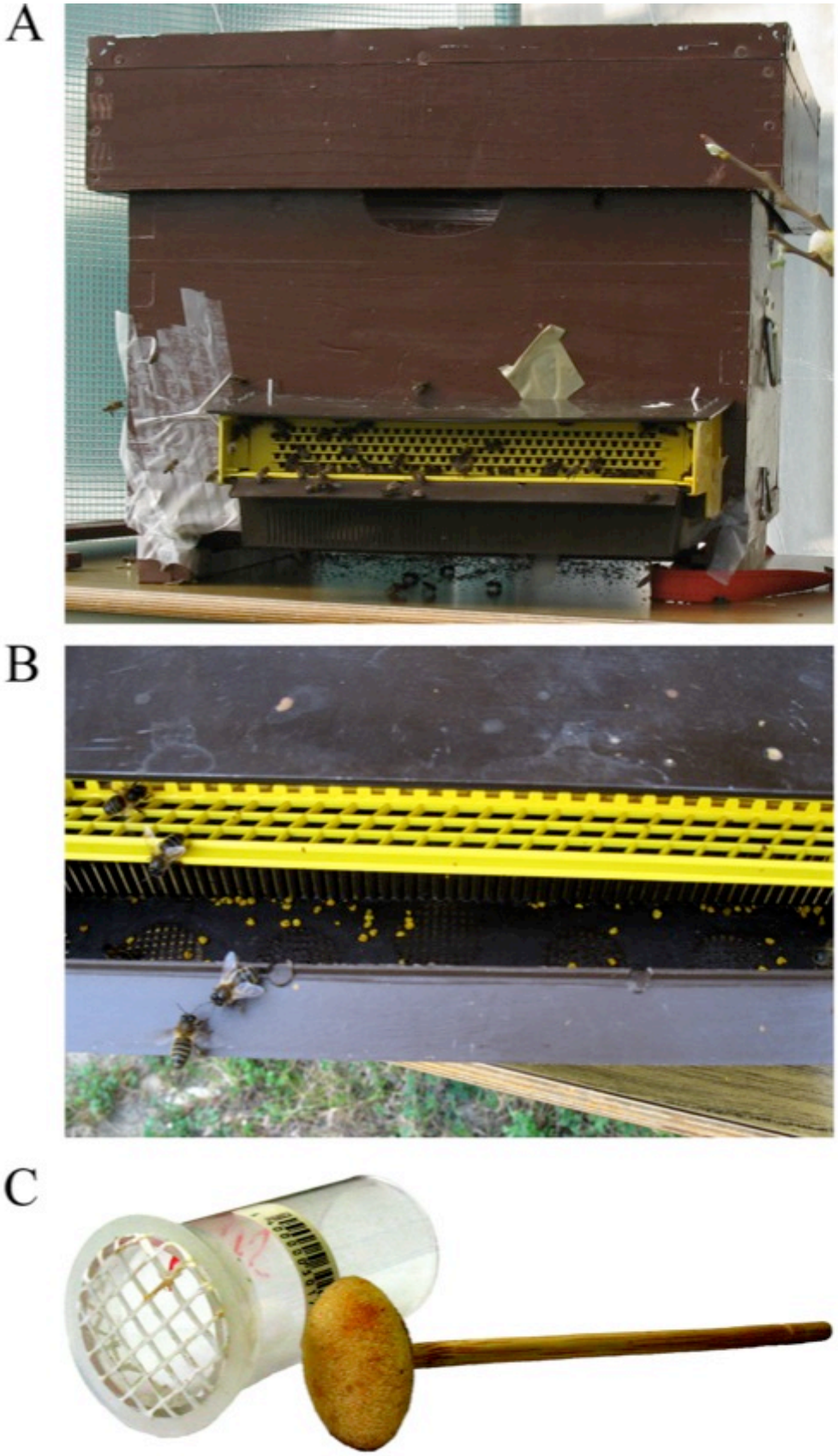


Figure 17. A : Ruche d'*Apis mellifera* équipée d'une trappe à pollen (P.-L. Zerck) ; **B :** Bac de récupération des pelotes de pollen (P.-L. Zerck) ; **C :** Tube de contention (P.-L. Zerck)

Tableau III : Tableau regroupant les stations de récoltes et les dates d'analyses des pollens étudiés

Plante	Origine du pollen	Station de récolte de la plante, date et récolteur	Moyens de récolte du pollen	Analyse stérolique: expérimentateur et date
Aster tripolium L.	*Aster tripolium* L.	P-B., Zeeland, Hulst, Saeftinghe 51°21'36,5''N 04°13'04,3''E -15m P.-L. Zerck, 2011	Diapason	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)		Serre Tube de contention	
	Apis melifera L.		Serre Trappe à pollen	
	Colletes halophilus Verhoeff		Terrain Spatule	
Calluna vulgaris Hull.	*Calluna vulgaris* Hull.	B., Anvers, Kalmthout, Kalmthoutse heide 51°22'47,9''N 04°13'04,3''E 21m; P.-L. Zerck, 2012	Diapason	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)	B., Anvers, Kalmthout, Kalmthoutse heide 51°22'47,9''N 04°13'04,3''E 21m P.-L.-Zerck, 2011	Serre Tube de contention	
	Apis melifera L.		Terrain Tube de contention	
	Colletes succinctus (L.)	B., Anvers, Kalmthout, Kalmthoutse heide 51°22'47,9''N 04°13'04,3''E 21m; P.-L. Zerck, 2011-2012	Terrain Spatule	
Hedera helix L.	*Hedera helix* L.	B., H., Jemappes, Avenue de la Faiencerie 50°27'1.16"N 3°53'43.14"E 28m P.-L. Zerck 2011	Diapason	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)		Serre Tube de contention	
	Apis melifera L.		Serre Tube de contention	
	Colletes hederae Schmidt & Westrich	B., H., Jemappes, Avenue de la Faiencerie 50°27'1.16"N 3°53'43.14"E 28m; P.-L. Zerck 2012	Terrain Spatule	
Hypochaeris radicata L.	*Hypochaeris radicata* L.	B., Hainaut, Erbisoeul, Chemin du Prince 78 50°30'23.88"N 3°53'55.91"E 78m P.-L. Zerck, 2012	Diapason	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)		Serre Tube de contention	
	Dasypoda hirtipes (Fabricius)		Terrain Spatule	
	Apis melifera L.	Belgique , Hainaut, Mons, Plaine de Nimy 50°27'54.64"N 3°57'25.05"E 35m P.-L. Zerck, 2012	Terrain Tube de contention	

Lythrum salicaria L.	*Lythrum salicaria* L.	Belgique, Hainaut, Baudour, Zoning de Baudour-Ghlin 50°27'44.25"N 3°51'29.17"E 24m P.-L. Zerck, 2012	Diapason	M. Vanderplanck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)		Serre Tube de contention	P.-L. Zerck 2013
	Apis melifera L.	Belgique , Hainaut, Mons, Plaine de Nimy 50°27'54.64"N 3°57'25.05"E 35m P.-L. Zerck, 2012	Terrain Tube de contention	
	Melitta nigricans Alfken	Belgique, Hainaut, Hollain 50°32'25,86"N 03°25'29.40"E 17m P.-L. Zerck, 2011	Terrain Tube de contention	M. Vanderplanck 2013
Medicago sativa L.	*Apis melifera* L.	Belgique, Hainaut, Lens 50°33'43.89"N 3°52'10.84"E 68m P.-L. Zerck, 2011	Terrain Trappe à pollen	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)	Belgique, Hainaut, Nimy le trou au sable 50°28'40.56"N 3°56'49.98"E 36m P.-L. Zerck, 2011	Serre Tube de contention	
	Medicago sativa L.		Diapason	M. Vanderplanck 2013
	Melitta leporina (Panzer)		Terrain Tube de contention	
Salix caprea L.	*Salix caprea* L.	Belgique, Hainaut, Blaton, Grande Bruyère 50°29'32,73"N 03°40'16,96"E 46m P.-L. Zerck – A. Pinczewski, 2011	Diapason	A. Pinczewski 2012
	Andrena vaga (Panzer)		Terrain Spatule	
	Apis melifera L.		Serre Trappe à pollen	P.-L. Zerck 2013
	Bombus terrestris (L., 1758)		Serre Tube de contention	

2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives

Le protocole utilisé pour l'analyse palynologique des stérols est celui de Vanderplanck *et al.* (2011) qui est basé sur le protocole de Lognay *et al.* (1989 ; 1992).

Les extractions ont été réalisées à l'Université de Mons (UMONS) au sein du laboratoire de zoologie du professeur Rasmont. Les analyses en GC-FID ont été réalisées à l'université de Liège (FUSAGx) au sein du laboratoire de chimie analytique du professeur Lognay.

Chaque pollen est analysé en triplicat et tous les produits utilisés au cours des analyses sont de qualité « pour analyses ».

Le pollen ainsi que les différents réactifs sont pesé à l'aide d'une balance analytique à quatre décimales (précision au dizième de milligramme).

2.3.1. Préparation et analyse des échantillons

Pour chaque pollen, trois aliquots de 20 mg de pollen lyophilisé ont été pesés.

Les stérols étant des lipides insaponifiables, la première étape de l'analyse consiste en une saponification qui a pour but de séparer la partie insaponifiable, contenant les stérols, de la fraction saponifiable. Cette étape se fait par homogénéisation de l'échantillon dans 2,5 ml d'hydroxyde de potassium méthanolique (KOH) 2M. L'homogénat est placé 1h dans un bain-marie à 80°C.
Une fois le temps écoulé, l'échantillon est refroidi à température ambiante et 1 ml de standard interne de bétuline (0,05mg/ml) ainsi que 2,5 ml d'eau milli-Q sont ajoutés. La concentration connue et précise du standard interne de bétuline permettra une estimation ultérieure de la concentration des différents composés de l'échantillon.

La fraction insaponifiable est extraite par épuisement grâce à trois rinçages de 5 ml d'éther diéthylique. L'extrait éthéré est ensuite rincé 3 fois avec 5 ml d'eau milli-Q, ce qui permet l'élimination des savons résiduels. Après rinçage, la phase éthérée est filtrée sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau et évaporée sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Après l'évaporation et le refroidissement, l'échantillon est repris dans 250 µl de chloroforme.

Les stérols de la fraction insaponifiable sont séparés des autres composants par une chromatographie sur couche mince. L'échantillon est déposé de manière uniforme et linéaire sur la largeur d'une plaque de verre recouverte d'une fine couche de silice. Le dépôt se fait grâce à un capillaire fixé sur un support de chomatographie préparative. Les plaques sont ensuite disposées verticalement dans une cuve de chromatographie qui contient 1 cm d'éluant (mélange de chloroforme, éther diéthylique et d'ammoniaque avec un ratio de 90 : 10 : 0,5).
Deux spots de référence (mélange de cholestérol et bétuline) sont déposés de part et d'autre de la ligne d'échantillon. Ces spots déterminent les limites inférieure (cholestérol) et supérieure (bétuline) de migration des stérols et du standard interne contenus dans l'échantillon.

Les stérols sont des composés incolores. Pour pouvoir les localiser sur la plaque de chromatographie suite à l'élution, une solution de 2',7'-dichlorofluorescéine éthanolique 0,2% est vaporisée de manière homogène sur la plaque de chromatographie sèche. La réaction chimique entre les stérols et la solution de révélation permet de détecter les composés stéroliques sous ultra-violet (254 nm).
Une fois le cadre de migration des stérols déterminé, la silice qu'il contient est grattée et récupérée pour purifier ainsi les stérols des autres composés restés sur la couche mince de silice (Fig. 18).

Les stérols sont ensuite extraits de la silice par épuisement à l'aide de trois rinçages (5 ml, 3 ml et 3 ml) au chloroforme. L'extrait chloroformé, qui contient alors les stérols purifiés, est filtré pour éliminer les résidus de silice et évaporé à sec sous un flux d'azote avant d'être silylé.

La dernière étape consiste en la dérivatisation des composés stéroliques de l'échantillon. Une silylation est effectuée en présence de 50 µl de SILYL-991 (mélange de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl)-trifluoroacétamide) avec 1% de triméthylchlorosilane (TMCS)) et de 50 µl de pyridine anhydre (catalyseur). La réaction s'opère durant 30 minutes dans un bain-marie à 90°C. La dérivatisation est ici la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement triméthylsilyl (TMS) qui stabilise les molécules pour leur analyse en chromatographie en phase gazeuse. En plus de stabiliser les différents composés, cette silylation abaisse la limite de détection en améliorant la symétrie des pics.

Après les 30 minutes de bain-marie, l'échantillon est évaporé à sec sous un flux d'azote et repris dans 200 µl de n-hexane.

L'échantillon final obtenu est analysé grâce à un GC-FID (Gaz Chromatography – Flame Ionization Detector). Les différents composés sont identifiés sur base de leur temps de rétention relatifs et sont quantifiés via la méthode du standard interne.

L'appareil utilisé pour ces analyses est un GC-800 *Top* series (ThermoQuest) doté d'un injecteur « On-column » AS-2000 (Thermofinnigan) et d'une colonne VF-5ms (30m, 0.25mm ID, df=0.25 µm). Les paramètres analytiques de température sont définis comme suit : 60°C (1 min) jusque 290°C (30°C/min) suivi d'un isotherme à 290°C (27 min) et d'une pointe thermique jusque 325°C (30°C/min) pendant 2 min. Le gaz vecteur est de l'hélium (90kPa).

Le traitement des chromatogrammes se fait à l'aide du programme ChromCard (© Thermo Electron S.p.A.). Tous les pics compris entre le cholestérol et la bétuline sont intégrés et leurs aires calculées. La concentration précisément connue du standard interne permet de calculer les différents stérols détectés.

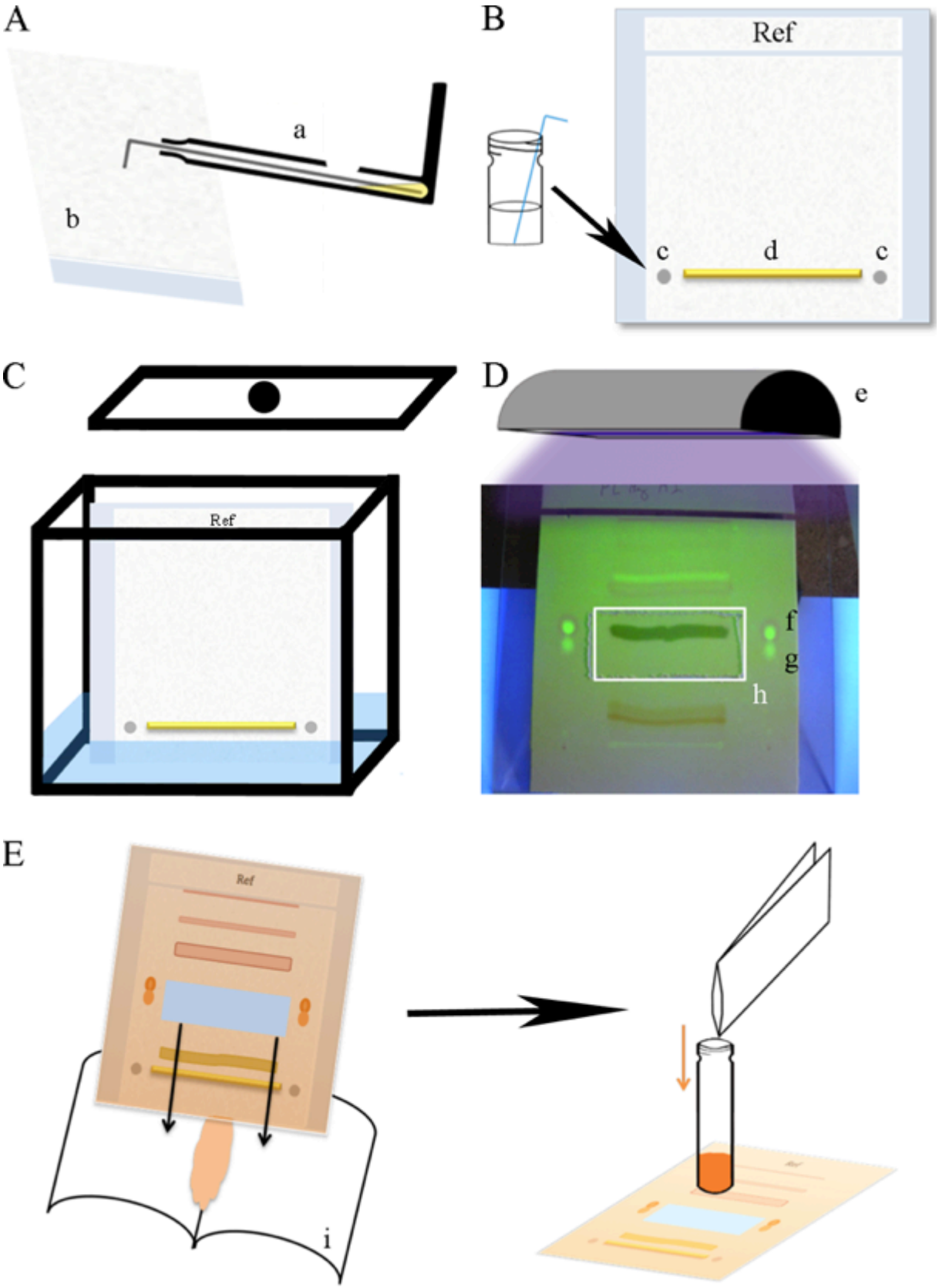


Figure 18 : Détail de la chromatographie sur couche mince. A : dépôt de l'échantillon sur une plaque de chromatographie a : réservoir du support de chromatographie préparative contenant l'échantillon ; b : plaque de chromatographie (P.-L. Zerck) ; **B :** Dépôt des spots de référence à l'aide d'un capillaire : c : spots de référence ; d : ligne de dépôt de l'échantillon (P.-L. Zerck) ; **C :** cuve à chromatographie (P.-L. Zerck) ; **D** : révélation des stérols : e : lampe UV ; f : spot de cholestérol ; g : spot de bétuline ; h : délimitation du cadre de récupération de la silice (P.-L. Zerck) ; **E** : Récupération de la silice : i : feuille de papier (P.-L. Zerck)

2.4. Analyses statistiques

2.4.1. Données brutes

Les compositions en stérols des 85 échantillons analysés au cours de cette étude sont résumées en tableaux qui reprennent l'abondance relative des différentes molécules et leur concentration.

Les analyses statistiques utilisées et les graphes présentés au cours de ce travail ont été réalisés à l'aide du logiciel R (version 3.0.0) et sont issus de l'exploitation des données exprimées en µg/mg de matière sèche (i.e. concentration absolue).

2.4.2. Analyse de la variance

Afin de détecter une différence significative entre les teneurs stéroliques totales des différentes sources de pollen, les données ont été soumises à une analyse de la variance à un facteur (One-Way ANOVA) suivie d'une comparaison multiple des moyennes (test post-hoc). Avant d'appliquer ces tests paramétriques, les conditions d'applications suivantes ont été vérifiées : (I) échantillonnage aléatoire, (II) observations indépendantes, (III) présence d'une variable quantitative, (IV) présence d'une variable qualitative à 3 niveaux ou plus, (V) homoscédasticité (égalité des variances) (test de Bartlett, H_0 = égalité des variances) et (VI) la distribution normale des résidus (test de Shapiro, H_0 = distribution normale). Lorsque ces conditions ne sont par rencontrées même après transformation des données, l'équivalent non-paramétrique du test (i.e. Kruskal-Wallis) a été effectué.

Le seuil α a été fixé à 5% pour les différents tests effectués (Bartlett, Shapiro et ANOVA). L'analyse de la variance retourne une *p-value* dont l'interprétation permet de détecter une éventuelle différence significative entre les pollens des différentes sources (pollen floral, pelotes de *Bombus terrestris*, pelotes d'*Apis mellifera* et les charges scopales de l'abeille spécialiste) pour chacune des espèces florales envisagées. Les différentes origines sont ensuite comparées deux à deux (test post-hoc) afin de mieux cibler les différences.

2.4.3. Analyses multivariées

Dans le domaine de la biologie, les tableaux de données « cas x variables » où chaque variable représente une dimension, sont toujours de taille conséquente. Ce grand nombre de variables empêche une visualisation aisée des données qui doivent dès lors être représentées dans un espace réduit en conservant un maximum de l'information contenue dans le jeu de données de départ.

L'analyse multivariée est traditionnellement utilisée pour les données de communautés écologiques. De par la forte similitude entre les matrices de données de communautés écologiques et les matrices de données chimiques, les méthodes d'analyses multivariées ont pu être appliquées au jeu de données.

2.4.4. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS)

Le positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS pour non Metric Multidimensional Scaling) est une représentation garphique qui permet de visualiser, dans un espace réduit, des différences (ex : de composition stérolique) entre divers échantillons.

Cette méthode d'ordination est basée sur des matrices de distance/dissimilarité entre objets (matrice de dissimilarité Bray-Curtis). Les objets sont placés dans un espace réduit à n

dimensions avec un nombre d'axes prédéfini. Afin de déterminer le nombre de dimensions le plus parcimonieux, 10 itérations du nMDS sont générées pour des dimensions allant de n=1 à n=5 et le seuil limite conventionnel de 0,2 (stress value) est appliqué. Dès que le nombre de dimensions a été établi, la procédure est à nouveau répétée (50 itérations) en utilisant le nombre représentatif de dimensions afin d'explorer au mieux l'espace d'ordination du système et de déterminer la configuration minimisant au mieux la stress value. Il en résulte un graphe nMDS où chaque point représente un réplica et chaque symbole un niveau (pollen floral, pollen scopal, pelotes de bourdon, pelotes d'abeille domestique). La distance spatiale séparant deux points représente la différence relative des compositions chimiques. Des points proches présentent dès lors une composition chimique similaire.

2.4.5. Analyse multivariée de la variance par test de permutation

Lorsqu'un jeu de données est composé de plusieurs variables dépendantes, il est possible d'effectuer plusieurs tests univariés indépendamment pour chaque variable. Cependant, cette méthode de travail augmente les chances de trouver un faux positif, c'est-à-dire une différence significative qui n'est peut-être pas réelle. Pour pallier à ce problème, de tels jeux de données doivent être traités par des analyses multivariées.

Une PerMANOVA (permutational Multivariate Analysis of Variance) ou analyse multivariée de la variance par test de permutation a été réalisée en utilisant l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis et 999 permutations (commande "Adonis", R-package vegan, Oksanen *et al*. 2012). Cette analyse permet de détecter une éventuelle différence significative entre les profils stéroliques des différentes sources polliniques étudiées. La méthode de la PerMANOVA est en fait une MANOVA basée sur des permutations ce qui la rend robuste à la non-normalité des données souvent rencontrée dans les jeux de données écologiques. Seule la condition d'homoscédasticité doit être vérifiée en utilisant la fonction "betadisper". Tout comme les analyses de variances univariées, la perMANOVA retourne une *p-value* permettant d'établir si il y a une différence significative entre les groupes testés sur base des compositions stéroliques.

2.4.6. Analyse des composés indicateurs

Afin de déterminer si un composé stérolique est indicateur d'un échantillon donné, par rapport aux autres échantillons, une analyse en composés indicateurs basée sur le principe de l'IndVal, généralement appliquée en écologie des communautés, a été réalisée. Un composé est considérée comme indicateur s'il est typique d'un groupe d'échantillons (il est absent des autres groupes) et s'il est présent dans tous les profils stéroliques de ce groupe. Pour chaque composé chimique, une valeur indicatrice, fonction de l'abondance et de la fréquence relative du composé, est calculée. Elle permet d'identifier le composé qui a la plus grande valeur indicatrice, et ce, pour chaque groupe. Une *p-value* est ensuite calculée pour toutes les combinaisons composé/groupe pour faire ressortir les composés significativement indicateurs. Ces *p-values* sont ensuite ajustées par la correction de Holm afin d'éviter l'augmentation de l'erreur de type I due aux analyses multiples.

3. RESULTATS

3.1. Palynologie

Les charges scopales des abeilles spécialistes récoltées ont été observées sous microscope (montage entre lame et lamelle) afin d'en déterminer la pureté. Une charge scopale est considérée comme pure si 95% ou plus du pollen la constituant provient d'une même espèce de plante.

Pour toutes les abeilles spécialistes présentées dans ce travail (i.e. *Andrena vaga*, *Colletes halophilus*, *Colletes succinctus*, *Colletes hederae*, *Dasypoda hirtipes*, *Melitta nigricans* et *Melitta leporina*) la pureté des charges scopales a été confirmée. Toutes les charges scopales possèdent une valeur d'au moins 95% du pollen de la plante hôte respective.

3.2. Analyses stéroliques

Les profils stéroliques des 85 échantillons ont été dressés sur base des chromatogrammes obtenus par analyse GC-FID (i.e. quantifications absolues et relatives pour chaque stérol détecté entre le cholestérol et la bétuline). Au total, 10 composés stéroliques ont été détectés. Les compositions stéroliques des différentes matrices sont détaillées dans les tableaux de IV à X et les chromatogrammes représentatifs de chacune des matrices sont repris en annexe (*Annexe II*).

Dans un premier temps, les analyses multivariées ont été effectuées de manière individuelle pour chaque espèce florale afin de détecter d'éventuelles modifications du profil stérolique entre le pollen floral et le pollen collecté par les espèces généralistes et spécialistes. Afin de cibler précisément les modifications majeures de composition, des analyses de composés indicateurs (IndVal) ont été effectuées. Parallèlement à ces analyses de composition stérolique, les différences de teneurs en stérols totaux ont également été investiguées par le biais d'analyses de la variance (ANOVA/Kruskal-Wallis).

Dans un second temps, une analyse multivariée globale a été réalisée sur l'ensemble du jeu de données afin d'établir si les profils stéroliques dépendent majoritairement de l'espèce florale investiguée (i.e. dissimilarités plus élevées entre espèces florales ; indépendamment du mode de collecte) ou de l'origine du pollen (i.e. dissimilarités plus élevées entre les différents modes de collecte, indépendamment des espèces florales).

3.2.1. *Aster tripolium*

Quel que soit le mode de collecte, le profil stérolique du pollen d'*Aster tripolium* est caractérisé par une abondance de ∂7-stigmastérol, de ∂7-avénastérol et de ß-sitostérol (*Tableau IV*).

Bien que les stérols majoritaires soient constants pour les différentes matrices, les analyses stéroliques révèlent la présence de faibles fluctuations au sein des profils en fonction de l'origine de l'échantillon. Ainsi, le ∂7-stigmastérol est présent en plus grande proportion dans les charge scopales de *Colletes halophilus* (29 – 31%) et en proportion plus faible dans les pelotes de *Bombus terrestris* (23%). Le ∂7-avénastérol est quant à lui présent en plus grande proportion dans le pollen floral d'*Aster tripolium* (27%) et en plus faible concentration dans les pelotes de *Bombus terrestris* (17%). En ce qui concerne le ß-sitostérol, la plus faible proportion est observée dans les charges scopales de *Colletes halophilus* (13 – 16 %) tandis que les pelotes de *Bombus terrestris* en contiennent la plus grande proportion (20%).

Parallèlement, d'autres composés présentent une moindre variation quel que soit l'origine du pollen. C'est le cas du ∂5-avénastérol qui reste stable d'une origine à l'autre,

allant de 7 – 8% (pollen scopal de *Colletes halophilus*) à 9% (pelotes d'*Apis mellifera*). Bien que la teneur en cholestérol soit assez stable dans les pelotes et charges scopales (14%), elle est en plus faible proportion dans le pollen floral (11%).

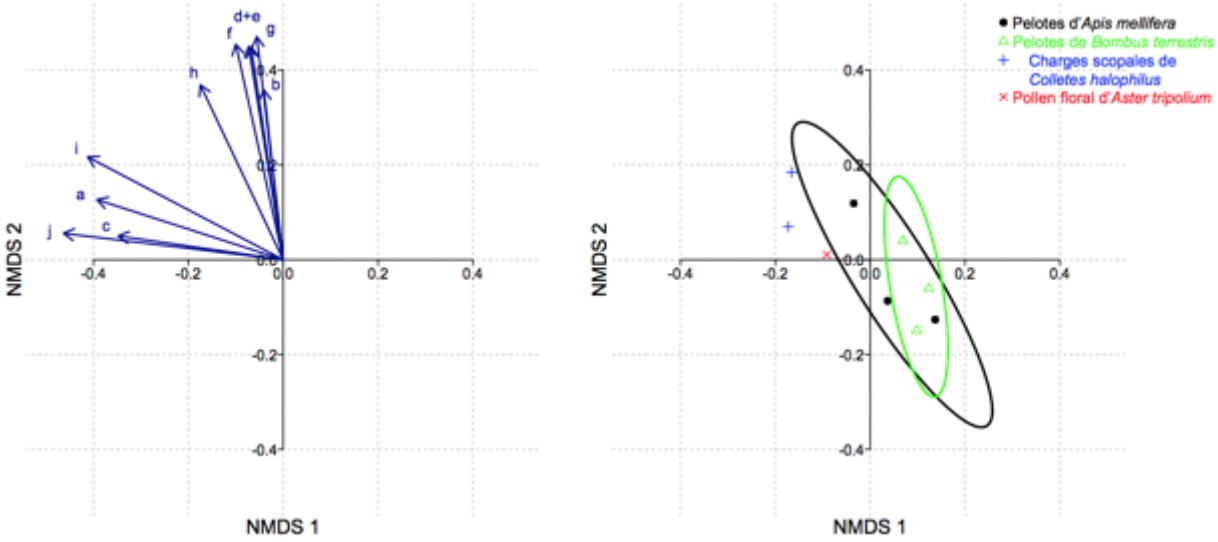
La concentration en stérols totaux varie de 5,6µg/mg de matière sèche dans les pelotes de bourdon à 9,9 – 11,8µg/mg de matière sèche dans les charges scopales de *Colletes halophilus* (*Tableau IV*).

Tableau IV: Composition stérolique des matrices polliniques d'*Aster tripolium*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	***Apis mellifera*** $\overline{X}$ ± **sd (n=3)**	***Bombus terrestris*** $\overline{X}$ ± **sd (n=3)**	***Colletes halophilus*** **Min-Max (n=2)**	***Aster tripolium*** **(n=1)**
Cholestérol	**13,60 ± 3,21**	**14,11 ± 3,25**	**13,46 – 14,01**	**11,06**
Desmostérol	4,15 ± 0,52	3,36 ± 1,02	2,30 – 3,04	2,62
24méthyl+camp	0,61 ± 0,19	1,48 ± 0,50	1,40 – 2,09	2,46
Stigmastérol	2,92 ± 0,48	3,92 ± 0,66	2,58 – 3,73	3,10
Inconnu_484	2,32 ± 0,32	2,20 ± 0,29	1,54 – 1,61	1,70
ß-sitostérol	**19,14 ± 1,12**	**20,04 ± 2,83**	**12,72 – 16,14**	**16,21**
∂5-avénastérol	**9,01 ± 1,27**	**9,70 ± 1,89**	**7,06 – 8,35**	**8,30**
Cholesténone	4,70 ± 1,68	4,70 ± 1,50	5,59 – 5,62	3,86
∂7-stigmastérol	**24,08 ± 2,03**	**23,12 ± 2,57**	**28,73 – 31,00**	**23,95**
∂7-avénastérol	**19,46 ± 0,36**	**17,36 ± 2,62**	**16,76 – 22,18**	**26,74**
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	6,39 ± 2,05	5,63 ± 1,06	9,90 - 11,77	8,12

La représentation d'ordination révèle que les points correspondants aux pelotes d'abeille mellifère et de bourdon se chevauchent tandis que les charges scopales de *Colletes halophilus* et le pollen floral d'*Aster tripolium* sont légèrement décalés. Cependant, aucun groupe ne se distingue clairement, ce qui laisse suggérer que les compositions stéroliques sont similaires (*stress value* = 0,0483 ; R^2 = 0,990 ; Fig. 19). Cette observation est corroborée par les résultats retournés par perMANOVA qui ne détecte aucune différence significative entre les compositions stéroliques des différentes matrices (F = 3,263 ; p = 0,088). De même, aucun composé indicateur n'a pu être mis en évidence.

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, le boxplot (Fig. 20) permet de distinguer deux groupes : (i) le premier groupe, caractérisé par une concentration en stérols totaux plus faible, comporte les pelotes d'*Apis mellifera* et les pelotes de *Bombus terrestris,* et (ii) le second groupe, caractérisé par des teneurs plus élevées, comprend les charges scopales de l'abeille spécialiste et le pollen floral. Le test statistique (Kruskal-Wallis) ne détecte cependant aucune différence significative (p = 0,178). Toutefois, le faible nombre de réplicas pour les charges scopales et le pollen floral (respectivement, n = 2 et n = 1) diminue la représentativité des observations.



Espace des variables Espace des individus

Figure 19: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Aster tripolium* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,0483 et R2 = 0,990.

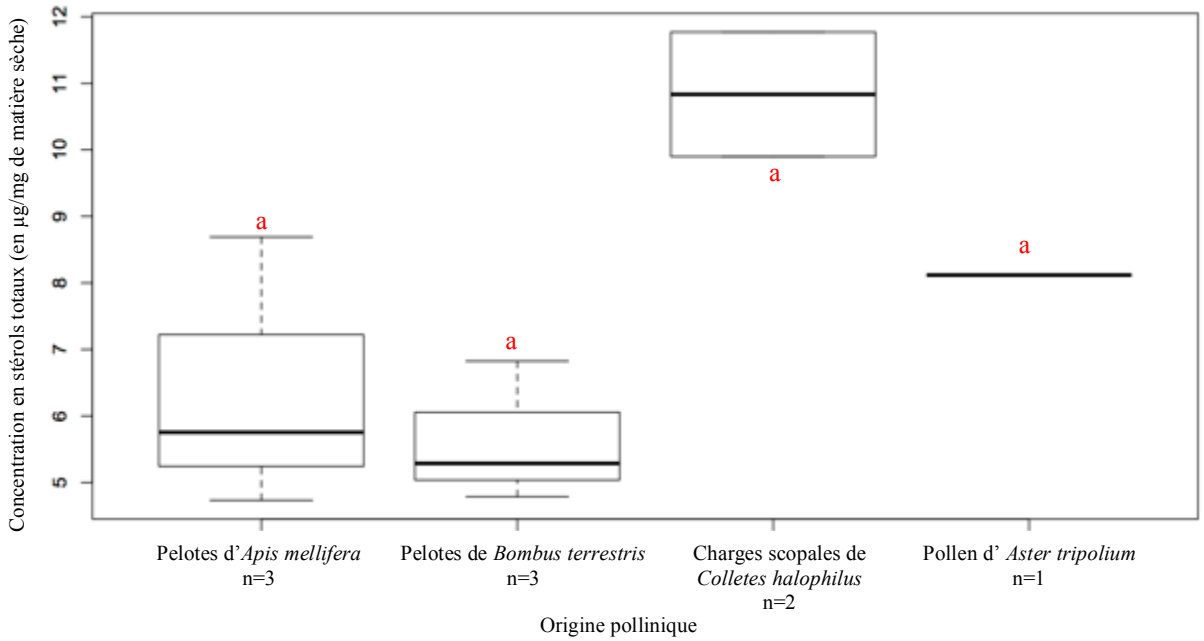


Figure 20: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Aster tripolium*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.2. *Calluna vulgaris*

Le pollen de *Calluna vulgaris* présente 3 stérols majeurs : le ß-sitostérol, le ∂5-avénastérol et le ∂7-avénastérol (*Tableau V*).

Indépendamment de l'origine du pollen, le ß-sitostérol se retrouve dans des proportions stables et varie de 41% dans les pelotes de *Bombus terrestris* à 43% dans les charges scopales de *Colletes succinctus*. De même, la teneur en ∂5-avénastérol est

relativement stable et oscille entre 25% (pelotes de *Bombus terrestris*) à 26% (pollen floral de *Calluna vulgaris*). En ce qui concerne la teneur en ∂7-avénastérol, elle est minimale dans les pelotes d'*Apis mellifera* (9%) et maximale dans les charges scopales de *Colletes succinctus* (12 – 13%).

Contrairement à ces composés majeurs, d'autres stérols semblent plus variables. Ainsi, le ∂7-stigmastérol est en proportion plus grande dans les pelotes d'abeille mellifère et de bourdon terrestre (respectivement 6,5% et 7%) alors que sa teneur n'est que de 4,5 – 5% dans les charges scopales de l'abeille spécialiste et de 3,5% dans le pollen floral de la bruyère commune. A l'inverse, le pollen floral de *Calluna vulgaris* contient proportionnellement plus de cholestérol (6% contre 3% dans les pelotes d'*Apis mellifera*) que dans les autres origines alors que son taux en desmostérol est plus faible (1% contre 3% dans les pelotes de *Bombus terrestris*).

En termes de concentration stérolique, les pelotes de *Bombus terrestris* (12,16µg/mg de matière sèche) présentent la plus faible teneur en stérols totaux alors que la plus importante s'observe dans les charges scopales de *Calluna vulgaris* (21,7 – 25,3µg/mg de matière sèche) (*Tableau V*).

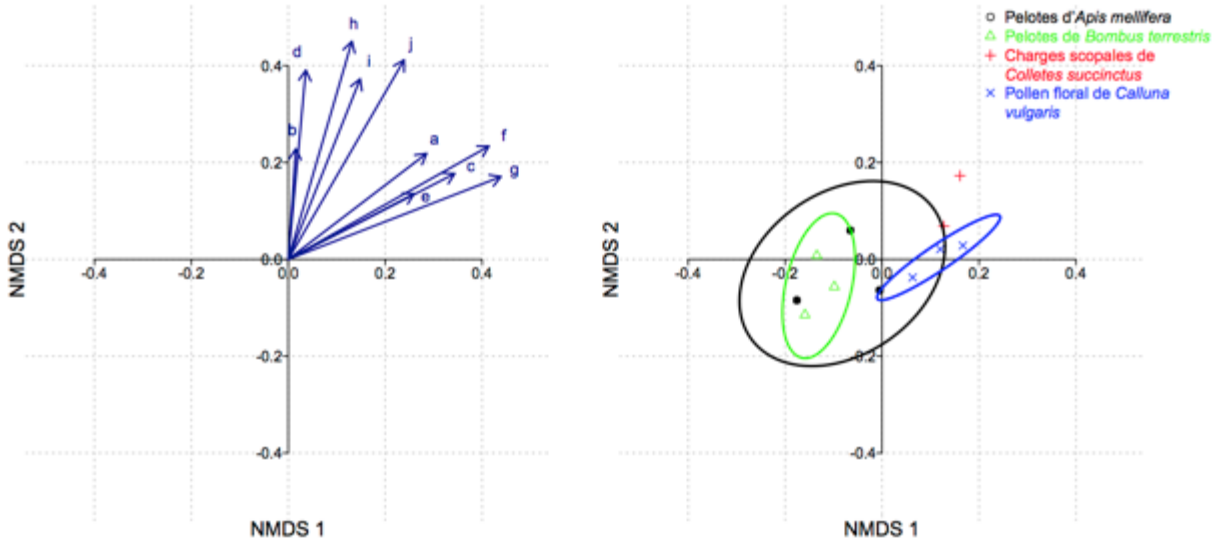
Tableau V: Composition stérolique des matrices polliniques de *Calluna vulgaris*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	*Apis mellifera* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Bombus terrestris* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Colletes succinctus* Min-Max (n=2)	*Calluna vulgaris* $\overline{X}$ ± sd (n=3)
Cholestérol	2,64 ± 1,22	3,10 ± 0,79	1,16 – 5,21	**6,22 ± 0,25**
Desmostérol	1,91 ± 0,28	2,65 ± 0,87	2,06 – 4,11	0,94 ± 0,20
24méthyl+camp	1,77 ± 0,23	1,46 ± 0,11	1,06 – 1,93	1,61 ± 0,12
Stigmastérol	3,85 ± 1,36	3,64 ± 0,80	3,28 – 4,34	3,03 ± 0,70
Inconnu_484	1,05 ± 0,32	0,96 ± 0,39	0,58 – 0,88	1,16 ± 0,14
ß-sitostérol	**41,78 ± 4,67**	**41,12 ± 2,60**	**40,31 – 43,23**	**41,99 ± 0,53**
∂5-avénastérol	**25,60 ± 3,30**	**24,95 ± 1,45**	**22,52 – 26,48**	**26,43 ± 1,14**
Cholesténone	5,39 ± 0,88	4,87 ± 0,15	4,33 – 4,73	4,54 ± 0,18
∂7-stigmastérol	**6,52 ± 4,60**	**6,89 ± 3,99**	4,45 – 4,64	3,47 ± 0,36
∂7-avénastérol	**9,48 ± 1,34**	**10,38 ± 0,59**	**11,74 – 12,97**	**10,61 ± 0,12**
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	13,74 ± 2,72	12,16 ± 1,31	21,69 – 25,34	19,61 ± 2,47

La représentation nMDS permet de distinguer deux groupes selon l'axe NMDS 1: (i) un groupe comprenant les pelotes d'*Apis mellifera* et de *Bombus terrestris*, et (ii) un groupe comprenant les charges scopales de *Colletes succinctus* et le pollen floral de *Calluna vulgaris*. Cependant, aucun chevauchement des points ne semblant clairement établi pour le pollen floral et les charges scopales de *C. succinctus*, ce dernier groupe pourrait être scindé en deux également (trois groupes distincts au total) (*stress value* = 0,0513 ; R^2 = 0,990; Fig. 21). Le test de la perMANOVA confirme que des différences existent entre les compositions stéroliques des différents groupes (F = 7,361 ; p = 0,006**). Cependant, aucun composé indicateur n'a pu être mis en évidence.

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, le boxplot (Fig. 22) permet de distinguer deux groupes : (i) un premier groupe caractérisé par des concentrations totales plus faibles et qui comprend les pelotes d'*Apis mellifera* et les pelotes de *Bombus terrestris*, et (ii) un second groupe caractérisé par des concentrations plus élevées et qui comprend les charges

scopales de l'abeille spécialiste ainsi que le pollen floral. L'ANOVA détecte une différence dans les concentrations en stérols totaux (p = 0,018). Cependant, le test post-hoc ne permet pas de structurer les données telles qu'observées sur le boxplot puisqu'il révèle que seuls les pelotes de *Bombus terrestris* et le pollen scopal de *Colletes succinctus* diffèrent entre eux (p = 0,047). Toutefois, ces résultats doivent être considérés avec prudence de part le faible nombre d'échantillons (n=2) pour les charges scopales de l'abeille spécialiste.



Espace des variables Espace des individus

Figure 21: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Calluna vulgaris* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,0513 et R2 = 0,990.

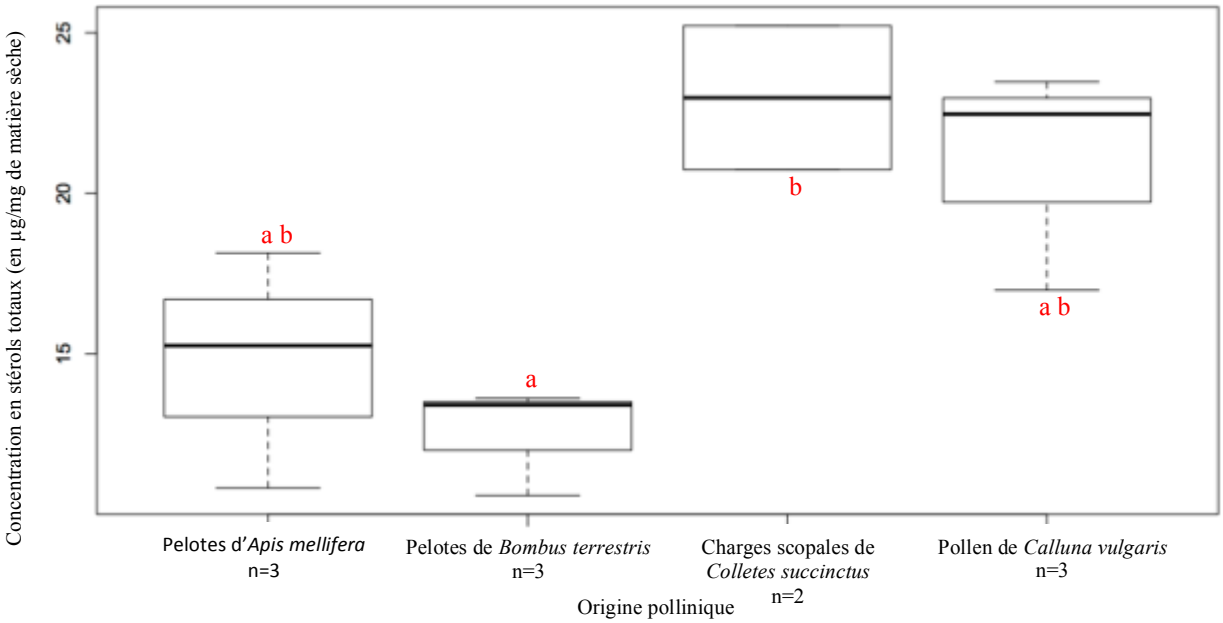


Figure 22: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Calluna vulgaris*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.3. *Hedera helix*

Le profil stérolique d'*Hedera helix* est caractérisé par les stérols majeurs suivants : le ∂7-stigmastérol, le ß-sitostérol, le ∂5-avénastérol, le ∂7-avénastérol et le stigmastérol. A nouveau, des variations peuvent être mises en évidence (*Tableau VI*).

Ainsi, alors que le ∂7-stigmastérol est présent en plus grande proportion dans le pollen floral du lierre (35%), sa teneur est plus faible dans les pelotes de *Bombus terrestris* (29%). De manière générale, sa concentration est légèrement plus élevée dans les charges scopales et dans le pollen floral que dans les pelotes d'abeille et de bourdon. A l'inverse, la concentration en ß-sitostérol est proportionnellement légèrement plus élevée dans les pelotes que dans les deux autres origines. La concentration relative la plus élevée est observée au sein des pelotes de *Bombus terrestris* (34%). La teneur la plus faible s'observe quant à elle dans les charges scopales de *Colletes hederae* (25%). Le ∂5-avénastérol est relativement variable d'une origine à l'autre et oscille entre 8% dans le pollen floral de *Hedera helix* et 15% dans les pelotes de *Bombus terrestris*. Le ∂7-avénastérol oscille également avec une certaine amplitude. La teneur en ce stérol est la plus haute dans les charges scopales de l'abeille spécialiste (12%) tandis qu'elle est la plus basse dans les pelotes de bourdon (5%).

Par ailleurs, le stigmastérol est présent en proportion relativement stable. La teneur la plus faible caractérise le pollen floral du lierre (5%) tandis que la teneur la plus haute est observée dans les pelotes de *Bombus terrestris* (7%).

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, les pelotes de *Bombus terrestris* et d'*Apis mellifera* présentent les concentrations les plus faibles avec 4,8µg/mg de matière sèche. Les stérols sont présents en plus grande concentration dans le pollen scopal de *Colletes hederae* (6,4µg/mg de matière sèche) dont la teneur est proche du pollen floral de *Hedera helix* (6,0µg/mg de matière sèche) (*Tableau VI*).

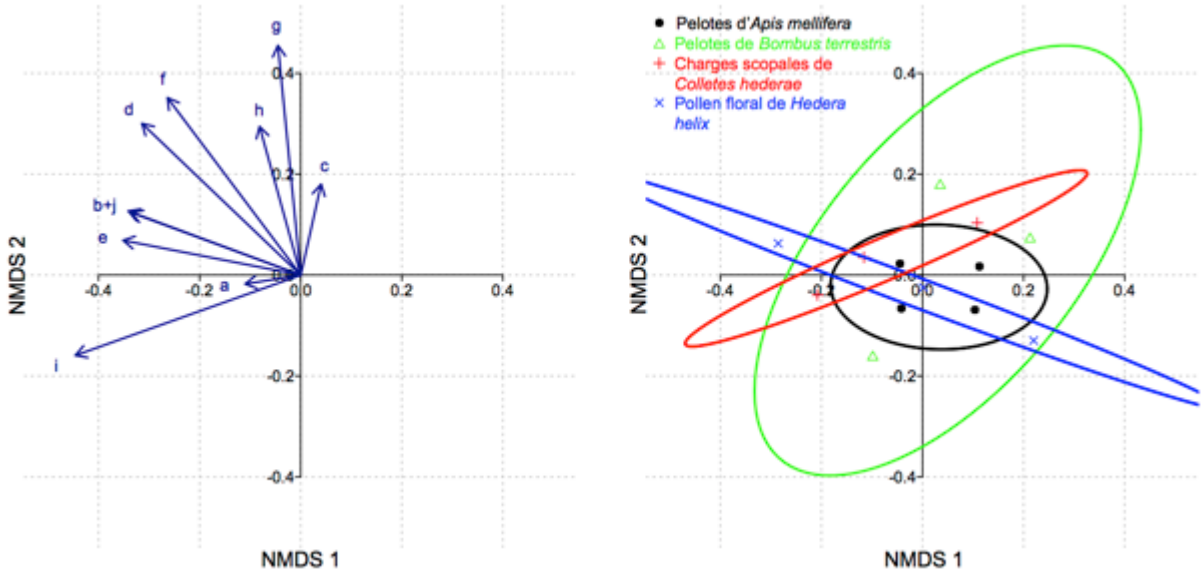
Tableau VI: Composition stérolique des matrices polliniques de *Hedera helix*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	*Apis mellifera* $\overline{X}$ ± sd (n=4)	*Bombus terrestris* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Colletes hederae* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Hedera helix* $\overline{X}$ ± sd (n=3)
Cholestérol	2,43 ± 1,91	2,18 ± 1,00	3,67 ± 3,42	4,51 ± 3,29
Desmostérol	0,65 ± 0,72	0,34 ± 0,36	1,08 ± 0,94	1,52 ± 1,68
24méthyl+camp	0,91 ± 0,15	1,96 ± 0,82	2,66 ± 3,56	1,61 ± 1,46
Stigmastérol	**5,68 ± 0,32**	**6,84 ± 1,12**	**4,94 ± 0,03**	**4,79 ± 0,83**
Inconnu_484	3,60 ± 0,76	2,14 ± 0,40	2,90 ± 0,78	2,78 ± 0,36
ß-sitostérol	**32,49 ± 4,00**	**33,55 ± 9,90**	**24,78 ± 2,37**	**28,31 ± 1,99**
∂5-avénastérol	**11,40 ± 2,93**	**15,16 ± 6,97**	**11,23 ± 3,90**	**8,41 ± 0,90**
Cholesténone	3,24 ± 2,11	3,47 ± 2,78	3,77 ± 1,23	3,54 ± 1,50
∂7-stigmastérol	**32,49 ± 5,06**	**29,01 ± 19,60**	**32,73 ± 10,81**	**34,82 ± 7,44**
∂7-avénastérol	**7,11 ± 0,32**	**5,36 ± 1,58**	**12,26 ± 1,30**	**9,72 ± 1,53**
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	4,84 ± 0,88	4,82 ± 1,17	6,41 ± 1,38	6,00 ± 3,25

La visualisation des données sur le graphe nMDS ne permet pas de distinguer les différentes matrices les unes des autres. En effet, toutes les ellipses se superposent au centre de l'ordination, témoignant de la forte similarité des différentes matrices (*stress value* =

0,113 ; R^2 = 0,946 ; Fig. 23). Cette observation est confirmée par la perMANOVA qui, bien que très sensible, ne détecte aucune différence significative (F = 0,533 ; p = 0,849). Par ailleurs, aucun composé indicateur n'a pu être mis en évidence pour l'une ou l'autre des matrices.

Le boxplot réalisé sur les concentrations en stérols totaux ne permet pas de distinguer des groupes précis. Bien que la boîte de dispersion relative au pollen scopal de *C. hederae* présente une médiane plus élevée que les autres boîtes, la variabilité est telle que le chevauchement entre boîtes persiste. La variabilité la plus importante est observée pour le pollen floral et ne permet pas de confirmer tendance observée dans le *tableau VI* (une concentration légèrement plus élevée dans le pollen scopal et floral que dans les deux types de pelotes) (Fig. 24). Par ailleurs, l'ANOVA ne détecte aucune différence significative entre les différentes origines du pollen de lierre (p = 0,612).



Espace des variables Espace des individus

Figure 23: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Hedera helix* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,113 et R2 = 0,946.

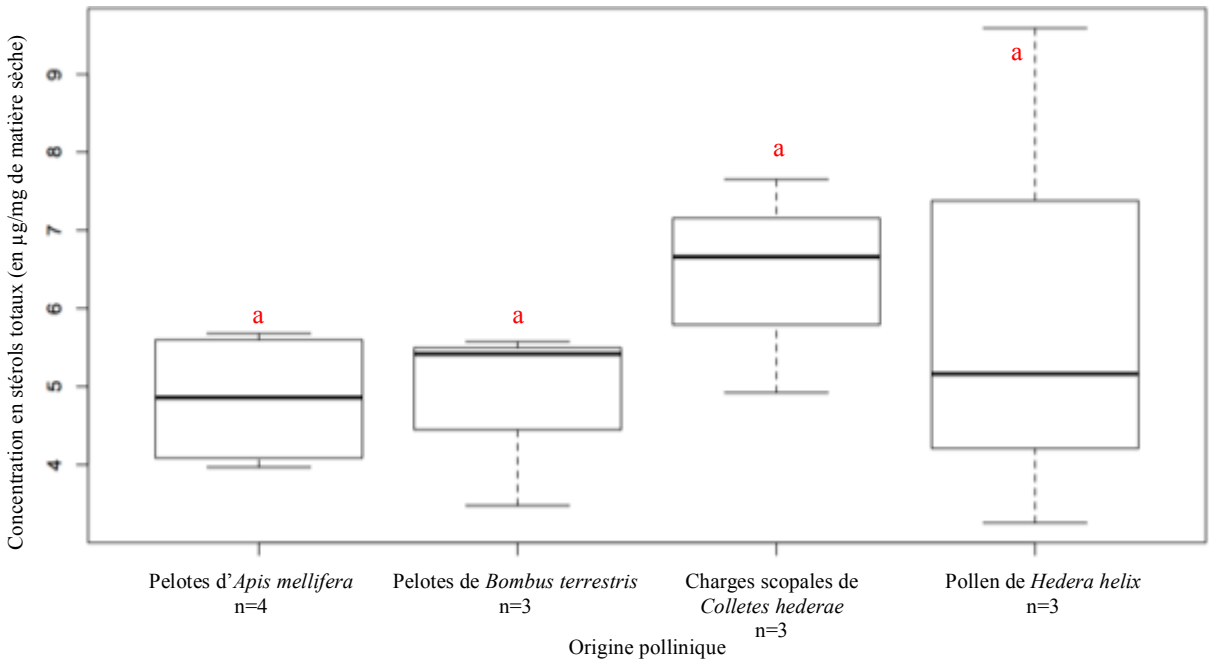


Figure 24: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Hedera helix*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.4. *Hypochaeris radicata*

Les stérols majoritairement présents dans le pollen de la porcelle enracinée sont, respectivement, le cholestérol, le ∂7-stigmastérol, le ∂5-avénastérol et le ß-sitostérol (*Tableau VII*).

Le cholestérol est présent en proportion très variable. Les taux les plus faibles sont observés dans les pelotes de *Bombus terrestris* (12%) ainsi que dans le pollen floral (16%). A l'inverse, les pelotes d'*Apis mellifera* sont plus riches en cholestérol qui représente 45% des stérols totaux. Le cholestérol atteint des proportions maximales dans les charges scopales de *Dasypoda hirtipes* où il représente plus de la moitié des stérols totaux (59%). Le ∂7-stigmastérol présente également des proportions variables qui oscillent entre 5% dans le pollen scopal de *Dasypoda hirtipes* et 33% dans les pelotes de *Bombus terrestris*. La concentration en ß-sitostérol est également variable. La teneur la plus faible se retrouve dans les charges scopales de *Dasypoda hirtipes* (7%) alors que la proportion la plus forte se retrouve dans les pelotes de *Bombus terrestris* (20%).

Le ∂5-avénastérol a une teneur stable d'une origine à l'autre. Elle varie de 17% dans les pelotes d'*Apis mellifera* à 19,5% dans les pelotes de *Bombus terrestris*.

Il est à remarquer que le ∂7-avénastérol fait partie des stérols majoritaires du profil du pollen scopal de *Dasypoda hirtipes* (6%) alors qu'il ne fait pas partie des stérols majoritaires des autres origines polliniques (de 2% dans les pelotes de bourdon à 4% dans les pelotes d'abeille mellifère).

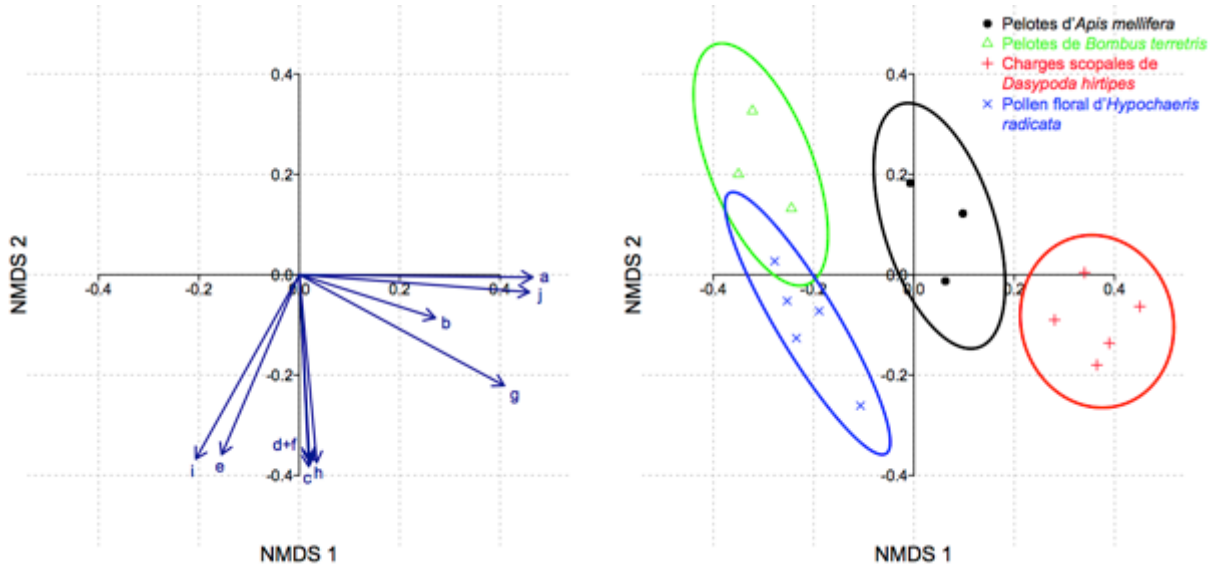
La teneur en stérols totaux varie fortement. Elle est la plus faible dans les pelotes de *Bombus terrestris* (3,6µg/mg de matière sèche) tandis qu'elle est la plus élevée dans le pollen scopal de l'abeille spécialiste (18,8µg/mg de matière sèche) (*Tableau VII*).

Tableau VII: Composition stérolique des origines polliniques de *Hypochaeris radicata*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	*Apis mellifera* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Bombus terrestris* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Dasypoda hirtipes* $\overline{X}$ ± sd (n=5)	*Hypochaeris radicata* $\overline{X}$ ± sd (n=5)
Cholestérol	**45,26 ± 3,02**	**12,42 ± 4,62**	**59,06 ± 5,68**	**14,88 ± 3,51**
Desmostérol	2,63 ± 1,53	1,55 ± 0,16	1,12 ± 0,84	0,96 ± 0,52
24méthyl+camp	2,36 ± 0,22	3,16 ± 0,46	1,45 ± 0,67	4,10 ± 0,65
Stigmastérol	1,04 ± 0,63	3,14 ± 1,72	1,51 ± 0,45	3,16 ± 0,98
Inconnu_484	0,83 ± 0,24	2,39 ± 0,36	0,47 ± 0,41	2,83 ± 0,15
ß-sitostérol	**10,36 ± 3,83**	**20,19 ± 6,16**	**6,58 ± 1,99**	**16,85 ± 3,50**
∂5-avénastérol	**17,17 ± 1,84**	**19,51 ± 3,24**	**17,31 ± 3,06**	**19,13 ± 0,41**
Cholesténone	1,18 ± 0,23	1,91 ± 0,78	0,99 ± 0,32	2,66 ± 1,36
∂7-stigmastérol	**14,84 ± 5,28**	**33,40 ± 9,64**	**5,31 ± 2,41**	**32,74 ± 4,98**
∂7-avénastérol	4,34 ± 0,21	2,33 ± 0,46	6,19 ± 1,26	2,68 ± 1,43
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	8,41 ± 2,01	3,63 ± 0,89	18,85 ± 3,023	7,33 ± 2,21

La visualisation des données sur le graphe nMDS permet de distinguer trois groupes selon l'axe NMDS 2 : (i) le premier se compose des pelotes de *Bombus terrestris* et du pollen floral, (ii) le deuxième se compose des pelotes d'*Apis mellifera,* et (iii) le dernier regroupe les charges scopales de *Dasypoda hirtipes.* L'orientation des vecteurs stéroliques suggèrent que le pollen scopal de *D. hirtipes* est caractérisé par une plus forte teneur en cholestérol et en ∂7-avénastérol (*stress value* = 0,092 ; R^2 = 0,971 ; Fig. 25). Le test de la perMANOVA confirme qu'une différence existe entre les compositions stéroliques des origines polliniques (F = 25,311 ; p = 0,001***). Comme attendu, l'analyse en composés indicateurs a permis de détecter 2 composés indicateurs du pollen scopal de *Dasypoda hirtipes* : le cholestérol (*indicator value* = 0,6780 ; p = 0,01) et le ∂7-avénastérol (*indicator value* = 0,6376 ; p = 0,01).

En ce qui concerne les concentrations en stérols totaux, le boxplot révèle que le pollen scopal de *D. hirtipes* se distingue des autres matrices par sa concentration en stérols plus élevée (Fig. 26). Cette observation est confirmée par le test de l'ANOVA qui détecte une différence significative entre les différentes matrices (p = 4.01e^{-06}***). La comparaison multiple des moyennes révèle que cette différence est due au pollen scopal de l'abeille spécialiste qui diffère significativement des autres origines polliniques en termes de concentration stérolique totale.



Espace des variables Espace des individus

Figure 25: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Hypochaeris radicata* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,092 et R2 = 0,971.

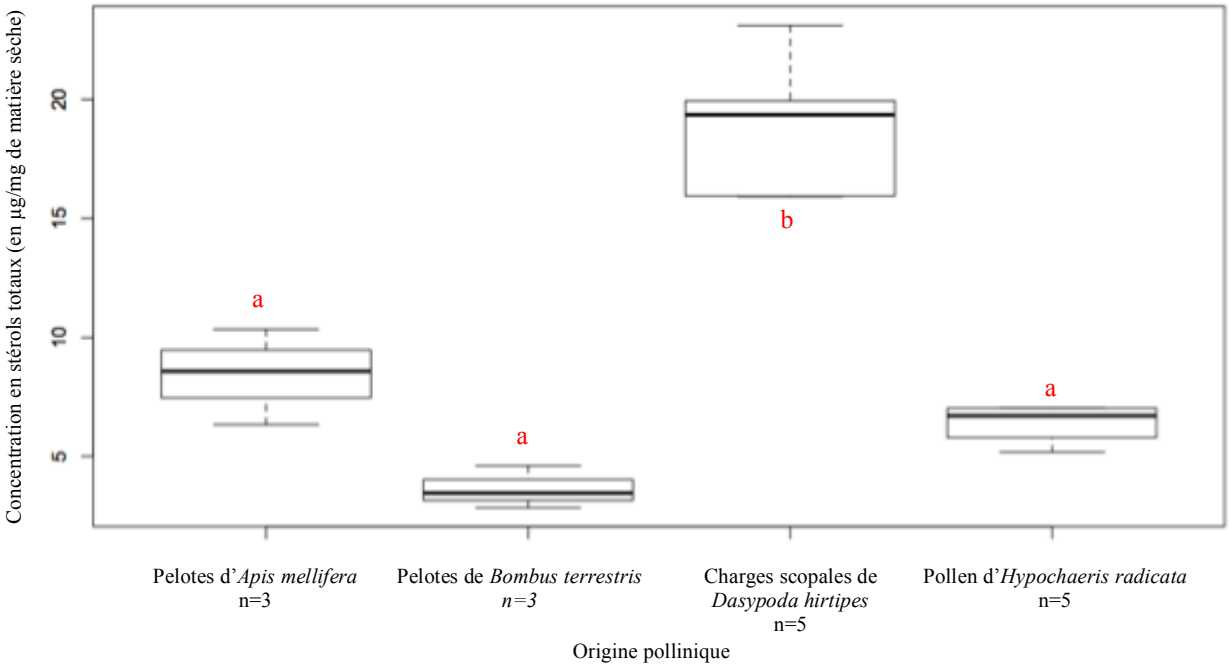


Figure 26: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Hypochaeris radicata*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.5. *Lyhtrum salicaria*

Le pollen de *Lythrum salicaria* se caractérise par la présence de 4 composés stéroliques majeurs : le ∂5-avénastérol, la fraction 24-méthylènecholestérol + campestérol, le ß-sitostérol et le ∂7-stigmastérol (excepté pour le pollen floral de *Lythrum salicaria*) (*Tableau*

VIII). Bien que les quatre composés soient les stérols majoritaires de tous les profils stéroliques, indépendamment de l'origine pollinique, quelques fluctuations de concentrations relatives peuvent être relevées dans le tableau VIII.

Le ∂5-avénastérol est présent en plus grande proportion dans les pelotes, plus particulièrement dans celles de *Bombus terrestris* où sa teneur atteint 34%. La proportion la plus faible observée est de 24% et correspond au pollen floral de *Lythrum salicaria*. La fraction 24-méthylènecholestérol + campestérol est le deuxième composé majeur. Sa teneur varie de 23% (pelotes de *Bombus terrestris*) à 33% (charges scopales de *Melitta nigricans*). Le ∂7-stigmastérol est également présent en proportion variable et sa proportion oscille entre 12% (pelotes de *Bombus terrestris*) et 5% (pollen floral).

A l'inverse, le ß-sitostérol a une teneur stable d'une origine pollinique à l'autre. La plus faible proportion est observée dans les pelotes d'*Apis mellifera* (20%) alors que la proportion la plus haute se retrouve dans le pollen floral (26%).

Il est à remarquer que le cholesténone fait partie des stérols majoritaires du profil du pollen floral de *Lythrum salicaria* (13%) et du pollen scopal de *Melitta nigricans* (8%) alors qu'il ne fait pas partie des stérols majoritaires des autres origines polliniques (de 1,5% dans les pelotes d'abeille mellifère à 2% dans les pelotes de bourdon). Le cholesténone serait donc proportionnellement moins présent dans les pelotes de bourdon et d'abeille mellifère.

La teneur en stérols totaux est relativement proche pour les deux types de pelotes et pour le pollen floral. La teneur la plus faible est rencontrée dans les charges scopales de l'abeille spécialiste (8,4µg/mg de matière sèche) tandis que la teneur la plus importante s'observe dans le pollen floral (16,9µg/mg de matière sèche) (*Tableau VIII*).

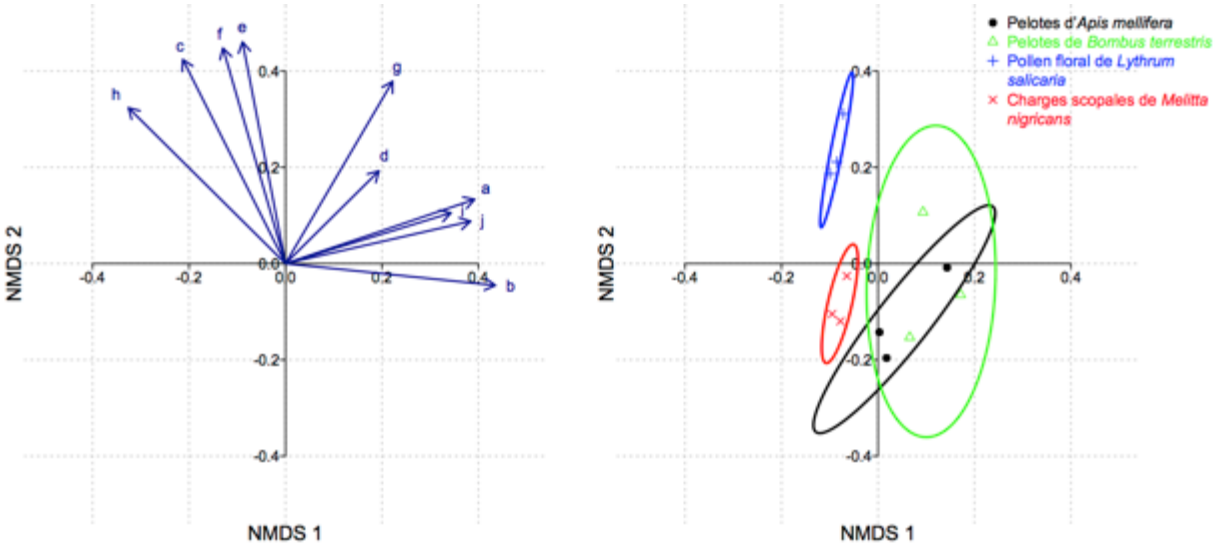
Tableau VIII: Composition stérolique des origines polliniques de *Lythrum salicaria*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	*Apis mellifera* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Bombus terrestris* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Melitta nigricans* $\overline{X}$ ± sd (n=3)	*Lythrum salicaria* $\overline{X}$ ± sd (n=3)
Cholestérol	1,74 ± 0,38	1,54 ± 0,66	0,16 ± 0,12	0,57 ± 0,11
Desmostérol	1,04 ± 0,39	0,97 ± 0,36	0,05 ± 0,02	0,06 ± 0,03
24méthyl+camp	**29,27 ± 3,95**	**23,14 ± 4,02**	**32,71 ± 2,46**	**27,94 ± 0,44**
Stigmastérol	1,38 ± 0,76	1,19 ± 0,30	0,65 ± 0,05	0,86 ± 0,14
Inconnu_484	1,68 ± 0,19	1,46 ± 0,14	1,71 ± 0,19	1,91 ± 0,14
ß-sitostérol	**20,06 ± 4,14**	**20,48 ± 2,45**	**20,86 ± 1,00**	**25,78 ± 0,38**
∂5-avénastérol	**32,10 ± 4,41**	**34,22 ± 5,99**	**26,28 ± 0,97**	**24,23 ± 2,51**
Cholesténone	1,55 ± 0,15	2,25 ± 0,65	**7,65 ± 0,44**	**13,05 ± 1,72**
∂7-stigmastérol	**9,40 ± 11,16**	**11,74 ± 10,22**	**8,33 ± 2,21**	4,77 ± 0,89
∂7-avénastérol	1,77 ± 0,54	3,02 ± 0,79	1,60 ± 0,94	0,83 ± 0,32
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	8,58 ± 2,38	10,16 ± 2,66	8,39 ± 0,78	16,87 ± 2,40

Le graphe nMDS permet de distinguer trois groupes distincts : (i) un groupe comprenant les pelotes des espèces généralistes dont les ellipses se chevauchent, suggérant des compositions stéroliques similaires, (ii) un groupe reprenant le pollen scopal de l'abeille spécialiste mais qui reste cependant similaire aux pelotes comme l'indique la proximité

spatiale, et (iii) un groupe représentant le pollen floral et qui se distingue des autres à la fois selon l'axe NMDS 2 et l'axe NMDS 1. L'orientation des vecteurs suggèrent que cette séparation est majoritairement due au cholesténone (*stress value* : 0,081 ; R^2 = 0,976 ; Fig. 27). Le test de la perMANOVA confirme qu'une différence existe entre les différentes origines polliniques (F = 7,568 ; P = 0,002**). Le test de l'IndVal ne détecte cependant aucun composé indicateur.

En ce qui concerne les concentrations en stérols totaux, le boxplot révèle que le pollen floral de *L. salicaria* se distingue des autres matrices par sa concentration en stérols plus élevée (Fig. 27). Cette observation est confirmée par le test de l'ANOVA qui détecte une différence significative entre les différentes matrices (p = 0,0044**). La comparaison multiple des moyennes révèle que cette différence est due au pollen floral qui diffère significativement des autres origines polliniques en termes de concentration stérolique totale.



Espace des variables Espace des individus

Figure 26: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Lythrum salicaria* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,081 et R2 = 0,976.

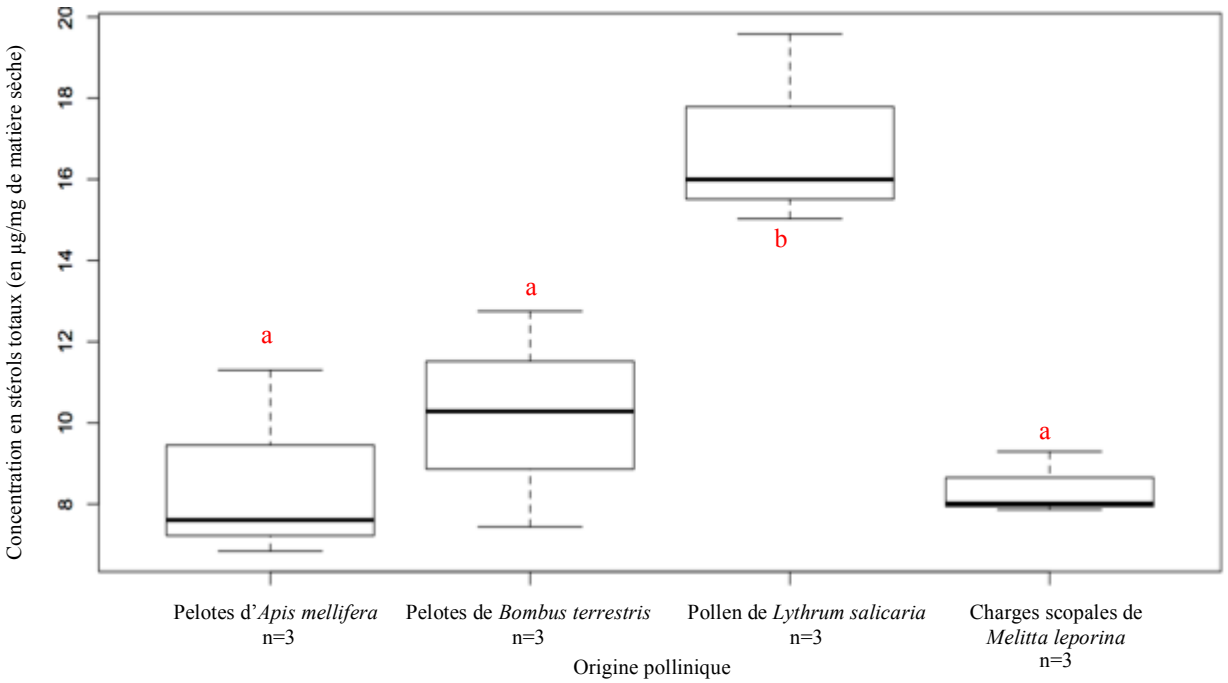


Figure 27: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Lythrum salicaria*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.6. *Medicago sativa*

Toutes origines confondues, les stérols majoritaires dans le pollen de *Medicago sativa* sont la fraction 24-méthylènecholestérol + campestérol, le ∂7-stigmastérol, le ∂5-avénastérol, le ∂7-avénastérol, le ß-sitostérol et le composé inconnu 484 (*Tableau IX*).

La fraction de 24-méthylènecholestréol + campestérol est la plus élevée dans les pelotes d'*Apis mellifera* (32%). La valeur la plus faible pour cette fraction est de 1 – 2% dans les pelotes de *Bombus terrestris*. Il est à noter que pour les concentrations relatives élevées, les variabilités sont très importantes avec un grand écart type qui atteint les deux tiers de la moyenne (±20%) dans le cas des pelotes d'*Apis mellifera* et la moitié de la moyenne (±10%) dans le cas des charges scopales de *Melitta leporina*. Le ∂7-stigmastérol est également présent dans des proportions très variables. La plus haute teneur est rencontrée dans le pollen floral de *Medicago sativa* (54%) tandis que la teneur la plus basse s'observe dans les pelotes d'*Apis mellifera* (3%). Le ∂5-avénastérol varie également avec la proportion la plus haute observée dans les pelotes d'*Apis mellifera* (36%) et la plus basse dans le pollen scopal de *Melitta leporina* (3%). Le ∂7-avénastérol, tout comme les composés précédents, est présent en des proportions très variables. Sa teneur oscille entre 3% dans les pelotes d'*Apis mellifera* et 24 – 27% dans les pelotes de *Bombus terrestris*.

Le ß-sitostérol semble être un composé plus stable. Sa teneur est cependant plus faible dans les charges scopales de l'abeille spécialiste (7%) et plus importante dans les pelotes d'*Apis mellifera* (13%). Le composé inconnu 484 semble également stable pour toutes les origines polliniques sauf pour les pelotes d'*Apis mellifera* où sa teneur est plus basse. Ce stérol est présent à raison de 8% dans le pollen floral de la luzerne alors que sa teneur chute à 1% dans les pelotes d'*Apis mellifera*.

Un dernier stérol attire l'attention : le cholesténone. Ce stérol fait partie des composés mineurs dans toutes les origines (de 2 à 3%) sauf dans le pollen scopal de l'abeille spécialiste où sa teneur atteint 18%.

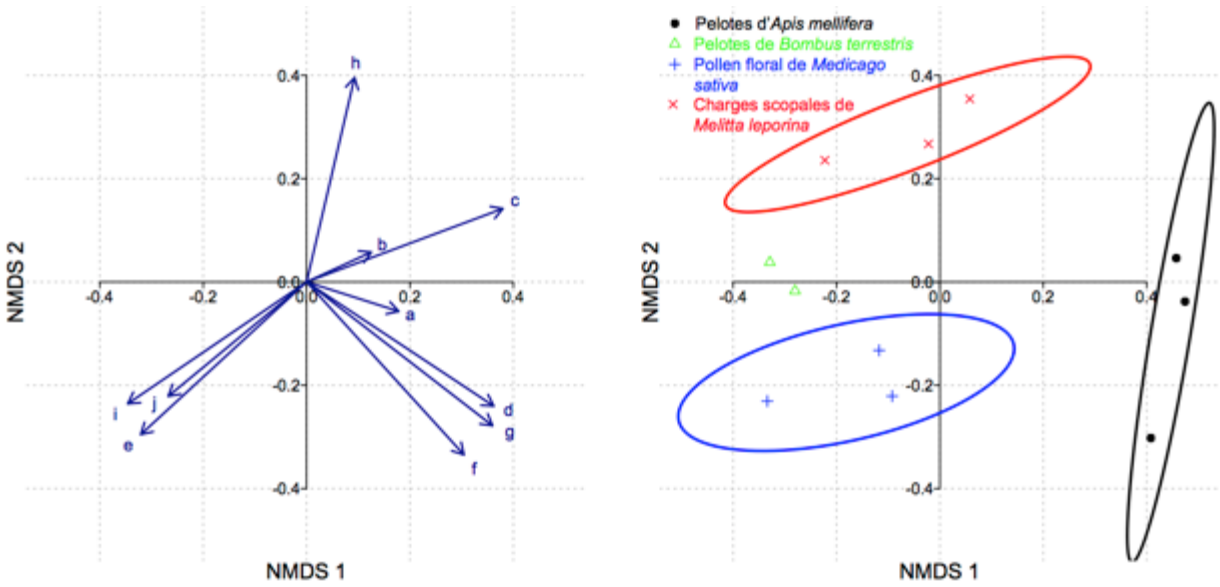
Les teneurs en stérols totaux varient de 2,9µg/mg de matière sèche dans les charges scopales de l'abeille spécialiste à 6,3µg/mg de matière sèche dans les pelotes d'*Apis mellifera* (*Tableau IX*).

Tableau IX: Composition stérolique des matrices polliniques de *Medicago sativa*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	***Apis mellifera*** $\overline{X}$ **± sd (n=3)**	***Bombus terrestris*** **Min-Max (n=2)**	***Melitta leporina*** $\overline{X}$ **± sd (n=3)**	***Medicago sativa*** $\overline{X}$ **± sd (n=3)**
Cholestérol	4,47 ± 1,62	3,56 – 12,40	1,71 ± 0,31	1,73 ± 1,36
Desmostérol	0,40 ± 0,26	0,63 – 1,21	0,21 ± 0,09	0,10 ± 0,06
24méthyl+camp	**32,38 ± 19,76**	1,19 – 2,12	**23,13 ± 10,06**	4,94 ± 4,94
Stigmastérol	3,09 ± 0,47	1,29 – 2,27	0,88 ± 0,84	1,41 ± 1,64
Inconnu_484	1,11 ± 0,51	**5,83 – 7,22**	**5,56 ± 2,27**	**8,31 ± 0,62**
ß-sitostérol	**13,26 ± 2,32**	**7,61 – 13,62**	**7,18 ± 0,88**	**10,22 ± 5,01**
∂5-avénastérol	**36,28 ± 20,12**	3,95 – 5,71	2,75 ± 1,46	**7,47 ± 4,60**
Cholesténone	3,37 ± 0,05	2,13 – 2,51	**18,06 ± 5,31**	2,23 ± 1,18
∂7-stigmastérol	2,70 ± 1,29	**36,63 – 39,23**	**37,35 ± 15,46**	**53,81 ± 7,87**
∂7-avénastérol	2,95 ± 0,85	**24,23 – 26,66**	3,19 ± 1,14	**9,78 ± 5,31**
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	6,27 ± 1,38	3,45 – 3,47	2,94 ± 0,32	4,84 ± 0,31

La visualisation des données sur l'ordination nMDS révèle que toutes les matrices diffèrent les unes des autres, aucun chevauchement n'est visible et les résultats se répartissent en 4 groupes distincts correspondant à leur origine de collecte (*stress value* = 0,109 ; R^2 = 0,951 ; Fig. 28). Selon l'espace des variables, ces différences seraient dues au cholesténone dans le cas du pollen scopal de *Melitta leporina ;* aux ∂7-stigmastérol, ∂7-avénastérol et inconnu 484 dans le cas du pollen floral et à la fraction 24-méthylènecholestérol + campestérol dans le cas des pelotes d'*Apis mellifera.* Le test de perMANOVA réalisé sur le jeu de données détecte une différence significative entre les différentes matrices (F = 12,082 ; p = 0,001**). Le test IndVal révèle que le cholesténone peut être considéré comme composé indicateur du pollen scopal de *Melitta leporina* (*indicator value* = 0,576 ; p = 0,04).

En ce qui concerne les concentrations en stérols totaux, le boxplot révèle que les pelotes d'*Apis mellifera* sont plus concentrées que les autres matrices. Le pollen floral, bien que moins concentré en stérols que les pelotes d'*Apis mellifera*, est plus concentré que les pelotes de *Bombus terrestris* et que les charges scopales de l'abeille spécialiste. Les boites correspondantes aux pelotes de *Bombus terrestris* et au pollen scopal de *Melitta nigricans* semblent se chevaucher (Fig. 29). Le test de l'ANOVA détecte une différence significative entre les différences matrices (p = 0,001**). La comparaison multiple des moyennes permet de répartir les matrices en 3 groupes : (i) un groupe présentant des concentrations plus élevées et comprenant les pelotes d'*Apis mellifera* et le pollen floral, et (ii) un groupe de concentration intermédiaire (pas de différence significative avec les 2 autres groupes) qui comprend les pelotes de *Bombus terrestris,* et (iii) un groupe de faible concentration qui comprend le pollen scopal de *Melitta leporina*.



Espace des variables Espace des individus

Figure 28: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Medicago sativa* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,109 et R2 = 0,951.

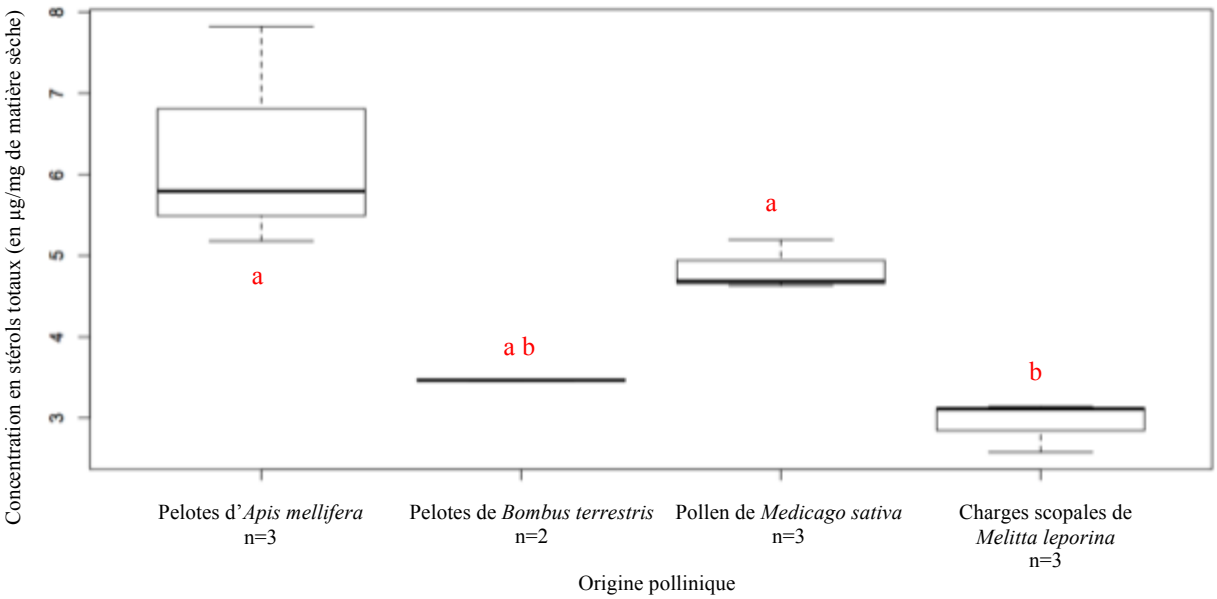


Figure 29: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Medicago sativa*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.7. *Salix caprea*

Le pollen de *Salix caprea* présente deux composés majeurs : le ß-sitostérol et le ∂5-avénastérol (*Tableau X*).

Le ß-sitostérol est stable entre origines polliniques, sa teneur est minimale dans les pelotes d'*Apis mellifera* (38%) et est maximale dans le pollen scopal d'*Andrena vaga* (47%).

Le ∂5-avénastérol est quant à lui présent dans des proportions plus variables. La teneur la plus basse est rencontrée dans les pelotes d'*Apis mellifera* (26,5%) tandis que la teneur la plus haute est observée dans le pollen floral de *Salix caprea* (40,5%).

Il est à noter que la concentration en cholestérol est plus élevé dans les pelotes d'*Apis mellifera* (17%) et de *Bombus terrestris* (5,5%) par rapport aux charges scopales d'*Andrena vaga* (1,5%) et au pollen floral (1%). Cependant, les valeurs observées pour les deux types de pelotes sont à considérer avec prudence de part le grand écart-type qu'elles présentent. Cette remarque est également applicable au ∂7-stigmastérol qui est présent en quantité plus importante au sein des pelotes d'*Apis mellifera* tout en présentant un écart-type aberrant.

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, elle est la plus importante dans le pollen floral (9,55µg/mg de matière sèche) et la plus basse dans les pelotes de *Bombus terrestris* (3,30µg/mg de matière sèche) (*Tableau X*).

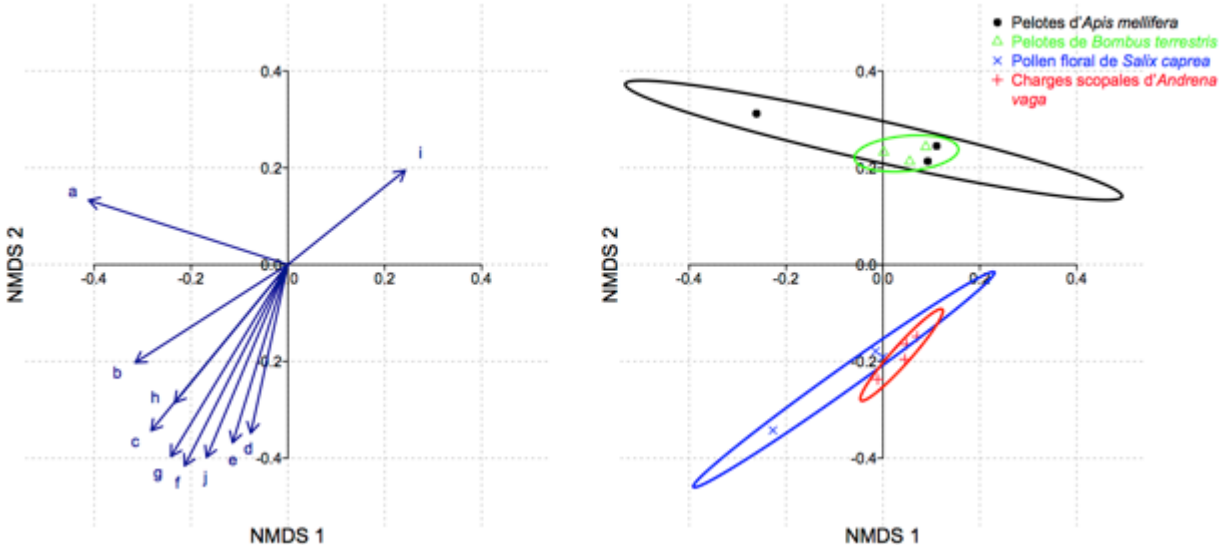
Tableau X: Composition stérolique des matrices polliniques de *Salix caprea*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/mg de matière sèche. Sont mis en gras les stérols les plus abondants (>5%). MS = Matière sèche ; 24méthyl+camp = 24-méthylènecholestérol + campestérol.

Stérols	*Apis mellifera* X ± sd (n=3)	*Bombus terrestris* X ± sd (n=3)	*Andrena vaga* X ± sd (n=4)	*Salix caprea* X ± sd (n=3)
Cholestérol	**17,25 ± 23,68**	**5,49 ± 5,61**	1,51 ± 0,29	1,37 ± 0,33
Desmostérol	1,26 ± 1,71	0,75 ± 0,75	1,98 ± 0,74	1,11 ± 0,18
24méthyl+camp	2,94 ± 0,90	3,41 ± 0,61	3,50 ± 0,31	4,51 ± 0,31
Stigmastérol	1,05 ± 0,51	0,99 ± 0,15	1,18 ± 0,64	0,89 ± 0,19
Inconnu_484	1,67 ± 0,20	1,68 ± 0,32	3,39 ± 0,29	1,35 ± 0,15
ß-sitostérol	**38,12 ± 10,57**	**44,41 ± 1,90**	**46,94 ± 2,18**	**45,07 ± 0,33**
∂5-avénastérol	**26,48 ± 8,16**	**32,43 ± 2,37**	**35,36 ± 1,27**	**40,55 ± 1,43**
Cholesténone	2,38 ± 1,26	2,44 ± 0,39	2,20 ± 1,17	2,01 ± 0,09
∂7-stigmastérol	**6,40 ± 4,00**	4,64 ± 2,95	1,18 ± 0,48	0,69 ± 0,04
∂7-avénastérol	2,45 ± 1,04	3,75 ± 0,27	2,76 ± 0,36	2,45 ± 0,22
Teneur en stérols totaux (en µg/mg de MS)	3,78 ± 0,81	3,30 ± 0,23	7,50 ± 0,77	9,55 ± 3,64

La représentation nMDS permet de distinguer très clairement deux groupes selon l'axe NMDS 2 : (i) un groupe composé des pelotes d'*Apis mellifera* et des pelotes de *Bombus terrestris,* et (ii) un groupe composé des échantillons relatifs au pollen floral et aux charges scopales de l'abeille spécialiste. Au sein de l'espace des individus, il est important de noter qu'un des réplicas des pelotes d'*Apis mellifera* est isolé des autres en faveur du cholestérol. Il est fort probable que cet échantillon soit à l'origine de la variabilité susmentionnée (*tableau X*) (*Stress value* = 0,039 ; R^2 = 0,996 ; Fig. 30). La perMANOVA confirme qu'il existe une différence significative entre les différents groupes (F = 12,691 ; p = 0,002**). Cependant, l'analyse en composés indicateurs ne permet pas d'établir une association composé-matrice satisfaisante (i.e. valeurs indicatrices inférieures à 0.5).

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, l'ANOVA détecte une différence significative entre les différentes origines polliniques (p = 0,000425***). Le boxplot ainsi que la comparaison multiple des moyennes permettent de structurer les matrices en deux groupes distincts : (i) un groupe présentant des concentrations élevées et qui comprend le pollen floral

ainsi que les charges scopales de l'abeille spécialiste, et (ii) un groupe de concentration plus faible qui comprend les pelotes des espèces généralistes (Fig. 31).



Espace des variables Espace des individus

Figure 30: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques dans le pollen de *Salix caprea* provenant de différentes origines. A gauche, l'espace des variables où chaque vecteur représente un composé stérolique avec a, cholestérol; b, desmostérol; c, 24-methylenecholesterol/campesterol; d, stigmastérol; e, inconnu 484; f, β-sitostérol; g, δ5-avenastérol; h, cholesténone; i, δ7-stigmastérol et j, δ7-avenastérol. A droite, l'espace des individus où chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,039 et R2 = 0,996.

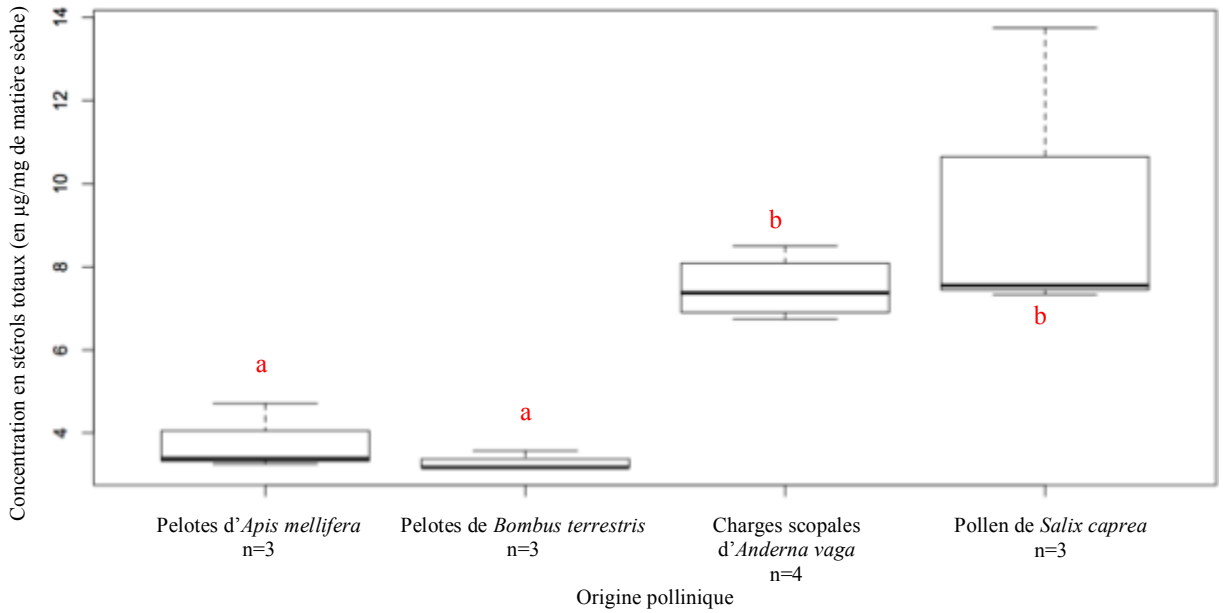


Figure 31: Boites à moustache basées sur les concentrations en stérols totaux des différentes origines polliniques du modèle *Salix caprea*. L'axe vertical représente la concentration en stérols totaux exprimée en µg/mg de matière sèche (variable quantitative). L'axe « origine pollinique » représente la variable qualitative.

3.2.8. Méta-analyse

L'importance du jeu de donnée a nécessité une représentation de l'ordination en trois dimensions afin de permettre une interprétation fiable des distances sur l'ordination. Les résultats de cette analyse montrent que les groupements se font par modèle floral (ex : *Aster tripolium*) et non par origine pollinique (ex : pelotes d'*Apis mellifera*), autrement dit les dissimilarités des profils stéroliques sont plus élevées entre espèces florales ; indépendamment du pollen. Ceci confirme que les pelotes de pollen, qu'elles aient été confectionnées par *Apis mellifera* ou *Bombus terretris* n'ont pas un profil stérolique commun et que leur profil dépend de la fleur butinée (*Stress value* = 0,118 ; R^2 = 0,915 ; Fig. 32).

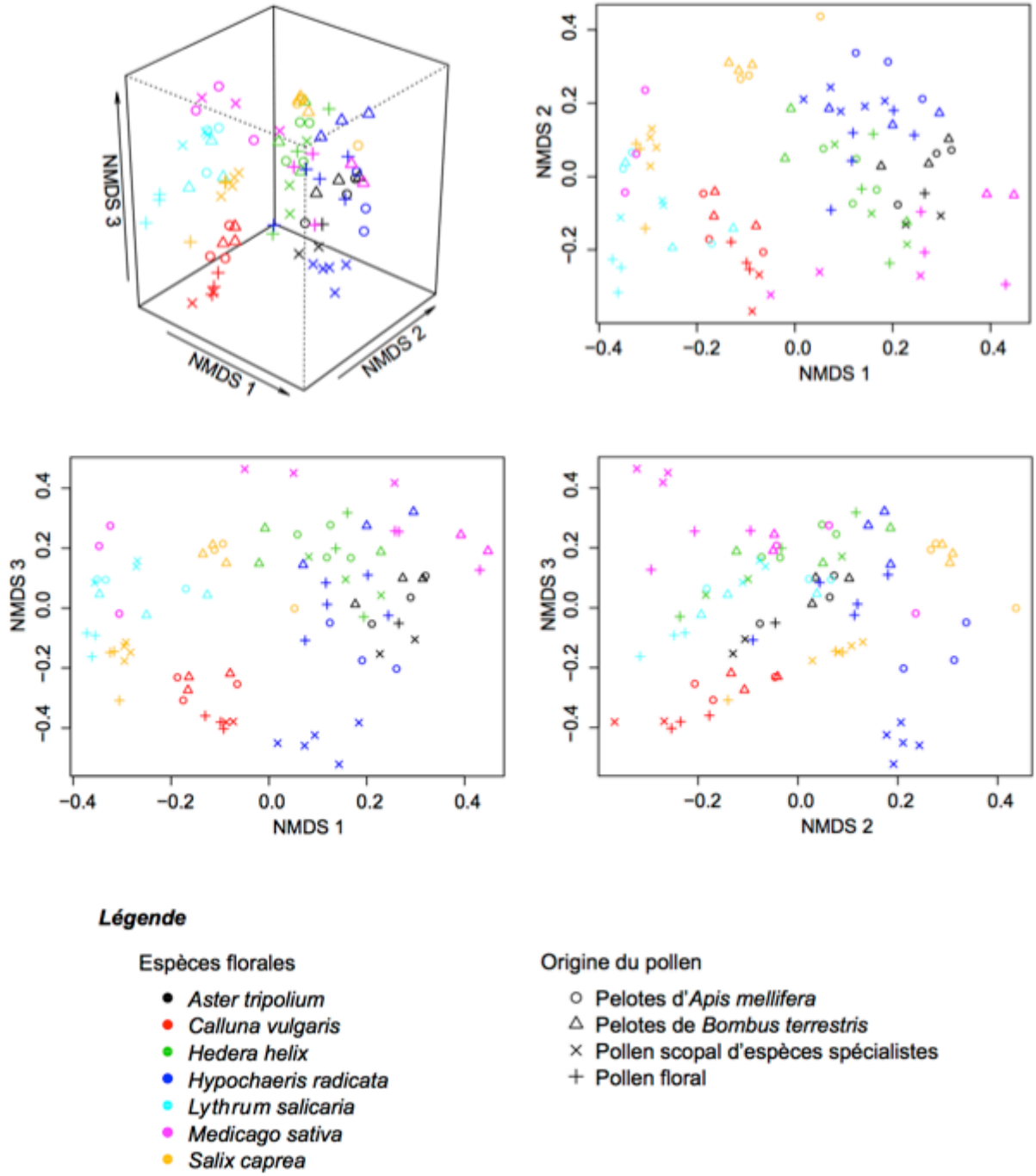


Figure 32: Représentation nMDS basée sur des distances de Bray-Curtis caluclées sur l'abondance absolue (µg/mg) des composés stéroliques de l'entièreté des échantillons étudiés. Seul l'espace des individus est représenté. Chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité: plus deux points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes. Stress value = 0,118 et R2 = 0,915.

4. DISCUSSION

4.1. Variabilité des stérols au sein des pollens floraux

4.1.1. Variabilité interspécifique

La majorité des sept plantes a un haut pourcentage de ß-sitostérol, de 24-méthylènecholestérol et de ∂5-avénastérol, ce qui concorde avec les observations relatées dans la littérature (Hopkins *et al*., 1991 ; Vanderplanck *et al*. *in prep*., Simal *et al*. 1988).

Les différentes analyses réalisées montrent aussi que les stérols sont des composés présents en proportions très variables chez les plantes comme cela avait déjà été montré par Feldlaufer *et al.*,(1993) et Vanderplanck (*in prep*). La figure 32 illustre parfaitement cette grande variabilité et montre que, de manière générale, les nuages de points correspondants à des espèces différentes ne se recouvrent pas. Deux espèces appartenant à la même famille des Asteraceae, *Hypochaeris radicata* et *Aster tripolium*, sont cependant plus proches l'une de l'autre. Bien que ce recouvrement soit léger, on peut supposer que cette ressemblance est due à la proximité phylogénétique des deux plantes. Ceci confirme la probable existence d'un signal phylogénétique qui avait également été raporté par Vanderplanck (2013). Une grande variabilité ainsi qu'un certain signal phylogénétique ont également été remarqués pour les protéines (Roulston & Buchmann, 2000).

Parmis les plantes remarquables, *Hypochaeris radicata*, se distingue par sa haute teneur en cholestérol. Le cholestérol est souvent présent dans le pollen mais en faible quantité (Rasmont *et al.*, 2005 ; Simal *et al.*, 1988 ; Vanderplanck, 2013 ; Barbier, 1966). Simal *et al.* (1988) a analysé 35 types de pelotes de pollen collectées par *Apis mellifera* et a trouvé une teneur moyenne en cholestérol de 4% avec des variations allant de 0,33% à 18,13%.

Un autre pollen intéressant est celui de *Lythrum salicaria*. Son pollen contient une haute concentration en cholesténone (13%), un cholestérol à 27 atomes de carbone par rapport aux autres pollens étudiés dans ce travail et par rapport à ce qui est observé dans la littérature. Barbier (1966) note une proportion de 0 à 15% de stérols en C27 (ex : cholestérol, cholesténone, desmostérol), le pollen d'*Hypochaeris radicata* n'étant pas pris en compte.

4.1.2. Variabilité intraspécifique

Dans la majorité des cas, une tendance semble se dégager : chez les abeilles qui humidifient le pollen récolté afin de le stocker sur les pattes postérieures (i. e. *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Melitta nigricans*, *Melitta leporina*), la concentration en stérols totaux est moins importante que dans le pollen floral ou dans les charges scopales des abeilles n'humidifiant pas le pollen récolté (i. e. *Andrena vaga*, *Colletes hederae*, *Colletes halophilus*, *Colletes succinctus* et *Dasypoda hirtipes*).

La composition stérolique du pollen floral d'*Aster tripolium* décrit par Vanderplanck (*in prep.*) semble assez différente de celle décrite dans ce travail. Les proportions sont très variables entre les deux compositions sauf pour le ∂7-avénastérol et le stigmastérol qui restent constants. Cependant, deux composés majeurs sont communs aux deux: le ∂7-avénastérol et le ∂7-stigamstérol. La concentration en stérols totaux est également différente: elle est de 3 µg/mg dans l'étude de Vanderplanck (*in prep.*) alors qu'elle est de 6 µg/mg dans ce travail. Cette différence est probablement liée à une variation temporelle, le pollen étudié par Vanderplanck ayant été analysé en 2008. Une variation liée à l'expérimentateur ou à l'injection elle même n'est cependant pas à exclure.

Le pollen de *Calluna vulgaris* a également été analysé par Vanderplanck (*in prep.*). Les différences entre les deux résultats sont moins importants que pour le pollen d'*Aster tripolium*. La différence majeure est rencontrée pour le stigmastérol qui atteint une proportion de 12% dans l'étude de Vanderplanck contre 3% obtenus dans nos résultats. Les concentrations en stérols totaux varient du simple au double (10µg/mg dans l'étude de Vanderplanck contre 20µg/mg dans ce travail). 3 composés majeurs sur 4 sont communs au deux analyses: le ∂7-avénastérol, le ∂5-avénastérol et le ß-sitostérol. Contrairement au pollen d'*Aster tripolium*, le pollen de *Calluna vulgaris* provient d'une origine géographique différente. Le pollen étudié par Vanderplanck provient d'Angleterre alors que celui analysé dans ce travail provient de Zeeland. Les faibles variations observées peuvent donc être dues à une variation géographique qui se caractériserait surtout par une différence en stérols totaux. Une légère variation géographique dans le profil stérolique avait déjà été détecté pour *Salix caprea*, la majorité de cette variation étant due au contenu protéique (Pinczewski, 2012, données non publiées).
Barbier (1966) a également étudié les stérols du pollen de *Calluna vulgaris* mais n'a relevé que trois stérols: le ß-sitostérol, les 24-méthylènecholestérol et le stigmastérol pour des proportions respectives de 10%, 10% et 80%. Cet auteur ne précise pas les techniques d'extraction employées mais il est fort probable qu'elles soient différentes de celles employées dans le présent travail. En plus des méthodes d'extraction et de purification différentes, la résolution du chromatographe utilisé au moment de l'étude était vraisemblablement plus basse que l'appareillage dont nous disposions. Ces différences peuvent avoir pour conséquences d'augmenter la quantification relative de certains composés.

De même que pour les deux premiers pollens cités, le pollen floral de *Hedera helix* a été étudié par Vanderplanck (*in prep.*). La composition relative est très similaire entre les deux analyses. La concentration totale est toutefois plus importante dans la présent travail (10µg/mg) que dans l'étude de Vanderplanck (4µg/mg). De nouveau les deux pollens ne sont pas originaires d'une même station. Ceci suggère que les légères différences observées sont dues à une variabilité géographique.
Les concentrations totales de stérols des origines considérées ne respectent pas la tendance générale observée (toutes les boîtes à moustache se recouvrent). Au moment de la récolte du pollen floral, le lierre était en fin de floraison et les fleurs ne procuraient que très peu de pollen. De plus, un nombre important de trichomes ont été récoltés en même temps que le pollen, ce qui a pu également influencer la composition stérolique. Ces mêmes trichomes ont été observés dans des pelotes de *Bombus terrestris*. Leonhardt & Blüthgen (2012) ont constaté que les bourdons ajoutent moins de nectar à leurs pelotes lorsque le pollen récolté est plus lourd. Si les trichomes alourdissent le pollen, et que les bourdons adoptent le comportement rapporté par Leonhardt & Blüthgen (2012), la concentration en stérols totaux devrait être plus proche de celle du pollen floral.

Barbier (1966) a également étudié le pollen de la porcelle enracinée (*Hypochaeris radicata*) et avait déjà rélaté une forte concentration en cholestérol dans la porcelle enracinée. Cependant la proportion trouvée par cet auteur atteint 90%. La proportion observée dans cette étude atteint 60%. Les différences observées sont probablement dues aux raisons exprimées au paragraphe discutant du pollen floral de *Calluna vulgaris*. Dans les deux cas, le cholestérol reste cependant le stérol dominant de ce pollen.
Le pollen scopal de *Dasypoda hirtipes* est caractérisé par du cholestérol et du ∂7-avénastérol. La composition uniflorale des charges scopales ayant été vérifiée, il est peu probable que cette différence provienne d'une composition pollinique différente. Il est donc fort probable qu'elle provienne d'un ajout de l'abeille solitaire. Cependant, aucune des références lues ne permet de discuter de cette hypothèse. La concentration totale en stérols est également plus importante dans les charges scopales de *Dasypoda hirtipes*. Le potentiel ajout réalisé par l'abeille serait donc particulièrement riche en stérols.

Comme dans l'étude de Huang & Grunwald (1988) le pollen floral de *Medicago sativa* étudié dans ce mémoire contient une grande quantité de ∂7-stérols. Ce pollen est l'un des plus variables parmi tous les pollens étudiés, non seulement au sein d'une même origine (ex : pollen floral) qu'entre différentes origines. Un composé indicateur a été trouvé au sein des charges scopales de *Melitta leporina*, le cholesténone. Cependant, la valeur *p* renvoyée par le test de l'IndVal est de 0,04, ce qui est fort proche du seuil de 5%. En outre, une nMDS réalisée entre le pollen floral et le pollen scopal ne détecte aucune différence. Il en va de même si les pelotes d'*Apis mellifera* sont ajoutées au jeu de données. Par ailleurs, les échantillons de pelotes de *Bombus terrestris* ne sont présents qu'en deux exemplaires, ce qui est statistiquement faible. La faible valeur *p* couplée à un faible échantillonnage des pelotes de *Bombus terrestris,* qui sont responsables des différences observées entre les compositions stéroliques, laisse penser qu'il serait raisonnable de ne pas considérer le cholesténone comme un composé indicateur des charges scopales de *Melitta nigricans*. La différence de concentrations observée entre les différentes origines polliniques pourrait toutefois ne pas être anodine.
Les pelotes d'abeille mellifère semblent plus riches en stérols que les autres origines florales. Les plantes qui ont servi pour la récolte des pelotes d'*Apis mellifera* provenaient d'un champ agricole. Il est connu qu'il existe différentes variétés de *medicago sativa* dont des variétés cultivées et sauvages bien distinctes (Bataillon *et al*, 2006). Des études ont également montré que la teneur en certains composés chimiques (ex : saponines) pouvait changer en fonction du cultivar considéré (Small *et al.*, 1990). Il n'est donc pas impossible que la variété cultivée par l'agriculteur contienne plus de stérol que la variété sauvage utilisée pour la récolte des autres origines florales (pelotes de *Bombus terrestris*, charges scopales de *Melitta leporina*, pollen floral de *Medicago sativa*).

L'analyse du pollen floral de *Salix caprea* concorde, pour les composés majeurs, avec les données recueillies par Vanderplanck (2013). Cependant les composés mineurs sont assez variables. Pinczewski (2012) a comparé les deux pollens, provenant de la même station et en a conclu que les petites variations tant au point du point de vue qualitatif que quantitatif pouvaient être le résultat d'une variation temporelle.

4.1.3. Variabilité méthodologique

Les fortes variations intraspécifiques rencontrées surviennent surtout lorsque les extractions stéroliques et les analyses en GC-FID des différentes origines (ex : pelotes) sont séparées par un laps de temps plus ou moins long (modèle *Medicago sativa* ou modèle *Salix caprea*). Lorsque les analyses sont temporellement proches, aucune variabilité majeure n'est rencontrée. Au sein du modèle *Salix caprea*, le test Indval a détecté certains composés potentiellement indicateurs dans le pollen floral et scopal mais n'ont pas été retenus à cause de leur faible valeur indicatrice (i.e. inférieure à 0,5). Cette petite différence n'a ni été rencontrée en comparant les pelotes (*Apis mellifera* et *Bombus terrestris*), analysées en 2013, entre elles, ni en comparant les données du pollen scopal et floral, analysées par Pinczewski en 2012, entre elles. Bien qu'interprétée différemment, une telle différence avait déjà été soulignée dans le travail de Pinczewski (2012, données non publiées) qui comparait ses données (pollen floral de *Salix caprea* et scopal d'*Andrena vaga* utilisé dans ce travail) à celles de Vanderplanck (2009, données non publiées) (pollen floral de *Salix caprea*).

Le protocole étant identique, cette différence peut s'expliquer par des paramètres d'injections légèrement différents tels que des cycles de chauffage plus ou moins long, ou des températures plus ou moins hautes. Ces petites variations pourraient légèrement modifier la résolution de l'appareil. Cette hypothèse peut être corroborée par une expérience personnelle (non détaillée dans ce travail) qui montre qu'un même échantillon peut donner des chromatogrammes différents après une modification du cycle de chauffage et un changement

de la pré-colonne qui était encrassée. La significativité de cette différence apparente n'a toutefois pas été testée. Cependant, ce même genre de variation a également été mentionné par Simal *et al.* (1988).

4.2. Modification du pollen floral par les abeilles polylectiques et oligolectiques

Les résultats de cette étude montrent que la modification de la composition stérolique du pollen par les abeilles généralistes n'est pas un comportement systématique. Aucun composé indicateur n'a été révélé par les tests IndVal. Les abeilles généralistes ne semblent pas compenser la grande variabilité des stérols des pollens par l'ajout d'un composé dans leurs pelotes. L'adaptation au régime alimentaire polylectique ne se ferait donc pas par le biais d'une adaptation comportementale au moment de la récolte du pollen.

Il en résulte que la composition stérolique du pollen semble un caractère peu contraignant pour les espèces généralistes. L'adaptation au polylectisme pourrait donc se faire surtout d'un point de physiologique, avec la capacité de tolérer une plus grande variabilité dans les concentrations stéroliques, mais aussi d'un point de vue comportemental. En effet, il a été mis en évidence qu'un transfert de 24-méthylène cholestérol se faisait au sein de la ruche. La direction de ce transfert peut se faire aussi bien entre ouvrières que des ouvrières aux larves (Svoboda *et al*., 1986). Ce type de comportement n'est pas connu pour d'autres abeilles.

Une autre constatation peut être faite sur la proximité des différentes origines polliniques dans un même modèle. Les pelotes d'*Apis mellifera* et de *Bombus terrestris* sont souvent plus proches entre elles qu'elles ne sont proches du pollen floral. C'est également ce qui est observé pour les espèces spécialistes humidifiant leurs charges scopales. Cette proximité est probablement due à l'ajout de nectar, comme en témoigne la majorité des boîtes à moustaches réalisée. Ceci démontre en partie la puissance de la nMDS qui reflète les variations quantitatives et qualitatives des échantillons étudiés. Des différences de concentrations en lipides de manières générales sont observées entre le pollen floral et le pelotes d'*Apis mellifera*, les pelotes étant moins concentrées en lipides (Human & Nicolson, 2006).

Les seuls composés indicateurs trouvés étaient dans des charges scopales des abeilles spécialistes. Il serait donc possible que certaines abeilles spécialistes ajoutent des composés dans leurs charges scopales comme c'est observé pour *Dasypoda hirtipes*. Par ailleurs cet ajout n'a été constaté qu'au sein de la famille des Melittidae, un clade basal dans la phylogénie des abeilles (Danforth *et al*., 2013; Danforth *et al*, 2006; Hedtke *et al*., 2013).

Parmi les abeilles spécialistes, une tendance semble se dégager : les individus appartenant à la famille des Melittidae semblent être spécialisés sur des plantes présentant un haut pourcentage de stérols à 27 atomes de carbones (i. e. cholestérol, cholesténone et desmostérol). *Dasypoda hirtipes* collecte du pollen riche en cholestérol (*Hypochaeris radicata*), *Melitta nigricans* collecte du pollen riche en cholesténone (*Lythrum salicaria*) et *Melitta leporina* est spécialisée sur une plante dont le pollen est riche en cholesténone. Cette dernière espèce ajouterait d'ailleurs du cholesténone dans ses charges scopales bien que la robustesse statistique de ce résultat soit faible.

Il est intéressant que *Dasypoda hirtipes* collecte une Asteraceae dont le pollen est très riche en cholestérol. Les Asteraceae étant les plantes hôtes de l'ancêtre de toutes les Dasypodaidae existantes (Dötterl & Vereecken, 2010; Michez *et al*., 2008; Michez *et al*., 2004), la haute teneur en cholestérol aurait pu aider au changement de diète entre les abeilles phytophages actuelles et les proto-abeilles carnivores. Cette transition aurait ainsi aidé à

l'acclimatation des composés floraux nouvellement exploités et à la résistance aux différentes toxines (Dötterl & Vereecken, 2010). Si cette hypothèse est valable pour le cholestérol, on peut supposer qu'il en est de même pour les autres stérols en C27. Ces stérols n'ont pas besoin d'être désalkylés par l'abeille et peuvent donc être utilisés directement ou convertis en cholestérol. Cette physiologie des stérols est rencontrée chez les clades basaux des Hyménoptères (Svoboda *et al*., 1978; Behmer & Nes, 2003; Grieneisen *et al*., 1993). Cependant, si la position phylogénétique de cette famille est avérée, Il n'est pas improbable que ces espèces disposent de caractères plésiomorphes tels que l'utilisation des stérols à 27 atomes de carbone. L'hypothèse de Dötterl & Vereecken (2010) peut donc être renforcée grâce à ces nouvelles données.

5. CONCLUSION

Ce mémoire de master a permis de confirmer la grande variabilité de la composition stérolique des plantes ainsi que la présence potentiel d'un signal phylogénétique. Aucune variation intraspécifique d'ordre géographique ou temporelle n'a été constatée.

L'hypothèse testée dans le cadre de ce mémoire : « les abeilles généralistes ajoutent un composé stérolique dans leurs pelotes de pollen alors que les abeilles spécialistes ne le font pas », est clairement réfutée. Aucun composé indicateur n'a été détecté pour les origines correspondant aux abeilles généralistes (pelotes d'*Apis mellifera* et/ou pelotes de *Bombus terrestris*). Il semble donc que l'adaptation majeure au polylectisme est probablement d'ordre physiologique plutôt que comportementale.

Il apparaît, au contraire, qu'au moins une abeille spécialiste, *Dasypoda hirtipes*, serait capable de rajouter du cholestérol et du ∂7-avénastérol dans ses charges scopales.

Par ailleurs, il ressort de cette étude que les abeilles de la famille des Melittidae collectent préférentiellement du pollen contenant un plus haut pourcentage de stérols à 27 atomes de carbones. Cette information permet d'étayer l'hypothèse que la transition entre le régime carnivore des Apoides sphéciformes et le régime phytophage des abeilles se soit fait en partie par le passage à une alimentation spécialisée sur des pollens riches en cholestérol ou autres stérols en C27.

6. PERSPECTIVES

Premièrement, il serait intéressant d'élargir l'échantillonnage des modèles où le nombre de réplicas était faible (ex : *Aster tripolium*). Il serait également intéressant d'élargir les analyses chimiques aux protéines, acides aminés et sucres.

Deuxièmement, d'autres pollens pourraient être considérés en ajoutant des espèces d'abeilles non considérées : des espèces sociales spécialistes (ex : *Bombus gerstaeckeri*) et des espèces solitaires généralistes (ex : *Osmia cornuta*). Le nombre de modèles végétaux pourrait également être augmenté pour vérifier l'hypothèse d'un signal phylogénétique.

La porte ouverte à l'hypothèse de l'exploitation des pollens riche en stérols à 27 atomes de carbones par les Melittidae doit mener à de plus amples analyses. Dès lors, il serait très intéressant de comparer un maximum de charges scopales provenant de Melittidae spécialistes à leur plantes hôtes respectives. Une telle étude permettrait de vérifier si toutes les plantes hôtes des Melittidae présentent les mêmes caractéristiques dans la composition stérolique de leur pollen.

7. BIBLIOGRAPHIE

Akihisa T., Kokke W.C.M.C., & Tamara T. (1991). *physiology and biochemistry of sterols, chapter 7.* Glenn W. Patterson and W. David Nes.

Ali J. G., & Agrawal A. A. . (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science , 17* (5) : 293-302.

Almeida E. A.B. (2008). Colletidae nesting biology (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie , 39* : 16-29.

Anderson K.E., Sheehan T.H., Eckholm B.J., Mott B.M., & DeGrandi-Hoffman G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (Apis mellifera). *Insectes Soc. , 58* : 431-444.

Bataillon T., Chanteret N., Cenci A., Gautier M.F., Jourdier P., Haudry A., Muller M.H., Poncet C., Prosperi J.M., Ronfort J., Roumet P., Santoni S., Thuillet A.C. and David J. (2006). Impacts d'événements démographiques et sélectifs sur la diversité des plantes cultivées : apport de l'analyse du polymorphisme allié à la théorie de la coalescence. *Les Actes du BRG, 6* : 1-15

Barbier M. (1966). Le 24-méthylène cholestérol (ergosta 5,24 (28) - diène 3 ß - ol). *Annales de l'Abeille , 9* (3) : 243-249

Behmer S. T. , & Nes W. D. (2003). Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Advances in Insect Physiology , 31* : 1-72.

Behmer S. T., & Elias D.O. (1999). The nutritional significance of sterol metabolic constraints in the generalist grasshopper *Schistocerca americana*. *Journal of Insect Physiology , 45* : 339-348.

Bellmann H. (1999). *Guide des abeilles, bourdons, guêpes et gourmis d'Europe. L'identification, le comportement, l'habitat.* delachaux et niestlé.

Bernays E. A. (2001). Neural limitations in phytophagous insects: implication for diet breadth and evolution of host affiliation. *Annual Review of Entomology , 46* : 703-727.

Bernard J. (2007). *apprentissage visuel chez l'abeille Apis mellifera: de la généralisation à l'extraction des règles.* Thèse de doctorat, Université Toulouse III – Paul Sabatier , Centre de Recherches sur la Cognition Animale (CRCA) .

Bischoff I., Feltgen K., & Breckner D. (2003). Foraging Strategy and Pollen Preferences of *Andrena vaga* (Panzer) and *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research , 12* (2) : 220-237.

Brodscheider R., & Crailsheim K. . (2010). Nutrition and health in honey bees. *Apidologie , 41* : 278-294.

Buchmann S. L. (1986). Vibratile pollination in Solanum and Lycopersicon: A look at pollen chemistry, in: D'Arcy, W. G. (Ed), Solanaceae II: Biology and systematics. 237-252.

Cardinal S., & Danforth B.N. (2013). *Bees diversified in the age of eudicots* (Vol. 280). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences.

Clayton R. B. (1964). The utilization of sterols by insects. *Journal of Lipid Research , 5*, : 3-19.

Clark A. J. , & Bloch K. (1959). Function of sterols in Dermetes vulpinus. *J. Biol. Chem. , 234* : 2583-2588.

Eickwort G. C., & Ginsberg H. S. (1980). Foraging and mating behavior in Apoidea. *Annual Review of Entomology , 25* : 421-446.

Danforth B., Sipes S., Fang J, 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* (41) : 15118-15123.

Danforth B. Eardley C., Packer L., Walker K., Pauly A., Randrianambinintsoa F.J., (2008). Phylogeny of Halictidae with an emphasis on endemic African Halictinae. *Apidologie , 39* (1) : 86-101.

Danforth B.N., Cardinal S., Praz C., Almeida E. A.B., & Michez D. (2013). The impact of Molecular Data on Our Understanding of Bee Phylogeny and Evolution. *Annu. Rev. Entomol , 58* : 57-78.

De Groot A. P. (1953). Protein and Amino Acid Requirements of the Honey bee (*Apis mellifera*). *Physiologia Comparata et d'Ecologia , 3* : 197-285.

Dötterl et al. (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., & Vereecken N. (2010). The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Can. J. Zool. , 88* : 668-697.

Feldlaufer M.F., Buchmann S.L., Lusby W.R., Weirich G.F., Svoboda J.A. (1993). Neutral sterols and ecdystoids of the solitary cactus bee *Diadasia* (Anthphoridae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 23 : 91-98

Genoud D., & Dittlo F. (2007). Contribution à la connaissance de *Colletes halophilus* Verhoeff (Hymenoptera, Colletidae) en France et confirmation de sa présence en Aquitaine. *OSMIA , 1* : 3-4.

Goulson D. (1999). Foraging strategies of insects for gathering nectar and pollen, and implications for plant ecology and evolution. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics , 2* (2) : 185-209.

Goulson D. (2010). *Bumblebees behaviour, ecology, and conservation Second Edition.* Oxford University Press.

Grieneisen M.L., Warren J.T., & Gilbert L.I. (1993). Early steps in ecdysteroid biosynthesis: Evidence for the involvement of cytochrome P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology , 23* : 13-23.

Gusenleitner F., & Schwarz M. (2002). Weltweite Checkliste der Bienengattung Andrena mit Bemerkungen und Ergänzungen zu paläarktischen Arten (Hymenoptera, Apidae, Andreninae, *Andrena*). *Entomofauna, Supplement , 12* : 1-280.

Hedtke S.M., Patiny S., & Danforth B.N. (2013). The bee tree of life: a supermatrix approach to apoid phylogeny and biogeography. *BMC Evolutionary Biology , 13* (138) : 1-13.

Heldt H.-W. (2005). *Plant Biochemistry Third Edition.* Elsevier Academic Press.

Hopkins W. G. (2003). *Physiologie Végétale.* DE Boeck.

Huang L.S., & Grunwald C. (1988). Effect of light on sterol changes in *Medicago sativa*. *Plant. Physio. 88* : 1403-1466

Hügel M.-F. (1962). Etude de quelques constituants du pollen. *Ann. Abeille , 5* (2) : 97-113.

Hügel M.-F. (1965). Sur les stérols du pollen. *Annales de l'Abeille , 8* (4) : 309-315

Jing X. , Vogel H. , Grebenok R. J. , Zhu-Salzam K., & Behemer S. T. . (2012). Dietary sterols/steroids and the generalist caterpillar *Helicowerpa zea*: Physiology, biochemistry and midgut gene expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology , 42* : 835-845.

Jürgens A., & Dötterl S. (2004). Chemical composition of anther volatiles in Ranunculaceae: genera-specific profiles in *Anemone*, *Aquilegia*, *Caltha*, *Pulsatilla*, *Ranunculus* and *Trollius* species. *American Journal of Botany , 91* (12) : 1969-1980.

Knowles A., (2011). Nest site preference of *Colletes halophilus* in East Anglia.

Kuhlmann M., Else G. R., Dawson A., & Quicke D. L. J. (2007). Molecular, biogeographical and phenological evidence for the existence of three western European sibling species in the *Colletes succinctus* group (Hymenoptera: Apidae). *Organisms, Diversity & Evolution , 7* : 155-165.

Kuhlmann M. (2011). Checklist of the species of the Bee Genus *Colletes* Latreille 1802. *NMH UK.www.nmh.ac.uk* .

Laloi D., Gallois M., & Pham-Delegue M.-H. (2000). Performances d'apprentissage olfactif chez l'abeille: variation en fonction de l'âge des ouvrières et étude comparative des réponses des reines et des mâles. *Actes Coll. Insectes Sociaux , 13* : 95-104.

Lambion J., Delvosalle L., & Duvigneaud J. (2004). *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes) cinquième édition.* Edition du jardin botanique de Belgique.

Leonhardt S. D., & Blüthgen N. (2011). The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie , 43* : 449-464.

Leshninger A.L. (1981). *Biochemistry second Edition.* Worht publishers.

L'Observatoire des Abeilles. (2011). L'andrène vague, *Andrena vaga*. *L'Observatoire des Abeilles , 2*.

Lognay G., Dreze P., Wagstaffe P.J., Marlier M., & 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., Marlier M., & 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 eperienced laboratories. *The Analyst , 117* (7) : 1093-1097.

Loper G. M., Standifer L.N., Thompson M.J., & Gilliam M. (1980). Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (Prunus dulcis) pollen and bee-bread. I. - Fatty acids, sterols, vitamins and minerals. *Apidologie , 11* (1) : 63-73.

Nation J. L. (2002). *Insect physiology and biochemistry.* CRC Press.

Nicolson S.W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology , 46* (2) : 197-204.

Medioni J., & Robert M.-G. (1969). L'apprentissage chez les invertébrés. *In: L'année psychologique , 69* (2) : 491-530.

Michener C.D. (1974). The Social Behavior of the Bees. *Harvard University Press* , 404pp.

Michener C. D. (1999). The corbiculae of bees. *Apidologie , 30* : 67-74.

Michener C. D. (2000). *The Bees of The World.* Baltimore and London : The Johns Hopkins University Press .

Michener C. D. (2007). *The bees of the world, second edition* (éd. 2). (T. J. Press, Éd.) Baltimore.

Michez D. (2002). Discussion morphologique et biogéographique sur le complexe sub-spécifique de *Dasypoda hirtipes* (Fabricius 1793) sensu Warncke (1973). *Notes fauniques de Gembloux , 49* : 35-45.

Michez D., Terzo M., & Rasmont P. (2004). Phylogénie, biogéographie et choix floraux des abeilles oligolectiques du genre *Dasypoda Latreille* 1802 (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). *Annales de la Société entomologique de France (n.s.) , 40* (3-4) : 421-435.

Michez D., Terzo M., & Rasmont P. (2004). Révision des espèces ouest-paléarctiques du genre *Dasypoda Latreille* 1802 (Hymenoptera, Apoidea, Melittidae). *Linzer biol. Beitr. , 36* (2) : 847-900.

Michez D., & Patiny S. (2005). World revision of the oil-collecting bee genus *Macropis* Panzer 1809 (Hymenoptera, Apoidea, Melittidae) with a description of a new species from Laos. *Annales de la Société Entomologique de France (n.s.) , 41* (1) : 15-28.

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., & Eardley C. (2007). Monographique revision of the bee genus Melitta Kirby 1802 (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae). *Annales de la Société entomologique de France (n.s.) , 43* (4) : 379-440.

Michez D., Joris I., & Iserbyt S. (2008). Eco-éthologie des visiteurs de *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) en Belgique. *Belgian Journal of Entomology , 10* : 37-55.

Michez D., Patiny S., Rasmont P., Timmermann K., & Vereecken N. (2008). Phylogeny and host-plant evolution in Melittidae s.l. (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie , 39* : 146-162.

Michez D., Patiny S., & Danforth B. (2009). Phylogeny of the bee family Melittidae (Hymenoptera: Anthophila) based on combined molecular and morphological data. *Systematic Entomology , 34* : 574–597.

Minckley R.L., & Roulston T.H. (2006). *Plant-Pollinator Interactions: From Specialization to Generalization.* Univ. of Chicago Press.

Moerman R. (2011). Impact de la diversité des ressources alimentaires sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). Travail de fin d'études.

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.

Pain J., & Maugenet J. (1966). Recherches biochimiques et physiologiques sur le pollen emmagasiné par les abeilles. *Annales de l'Abeille , 9* (3) : 209-236.

Pinczewski A. (2012). Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae). Mémoire de master. UMONS : 97pp.

Pouvreau A. (2004). *Les insectes pollinisateurs.* Delachaux et Niestlé.

Praz C. J., Müller A., & 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., Müller A., & Dorn S. (2008b). Host recognition in a pollen-specialist bee: evidence for a genetic basis. *Apidologie , 39* : 547-557.

Rasmont P. (1984). Les bourdons du genre *Bombus* Latreille sensu stricto en Europe Occidentale et Centrale (Hymenoptera, Apidae). *Spixiana , 7* : 135-160.

Rasmont P., Coppée A., Michez D., & DE Meulemeester T. (2008). An overview of the Bombus terrestris (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Annales de la Société Entomologique de France , 44*, 243-250.

Rasmont P., Regali A. , Ings T.C., Lognay G., Baudart E., Marlier M., et al. (2005). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology , 98* (3) : 656-663

Roberson C. (1925). Heterotrphic bees. *Ecology , 6* : 412-436.

Roulston T.H., & Cane J.H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution , 222* : 187-209.

Rouslton T.H., Buchmann S.L. (2000). A phylogenetic reconsideration of the pollen stearch-pollination correlation. *Evolutionary Ecology Research, 2* : 627-643

Roulston T.H. (2005). Pollen as a reward, in: Dafni A., Kevan P.G. and Husband B.C., 2005. *Practical Pollination Biology* : 234-260.

Schlindwein C., Wittmann D., Martins C.F., Hamm A., Siqueria J.A., Schiffer D., (2005). Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and intro reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution , 250* : 147-156.

Schmidt K., & Westrich P. (1993). *Colletes hederae* n. sp., eine bisher unerkannte, auf Efeu (Hedera) spezialisierte Bienenart (Hymenoptera: Apoidea). *Entomologische Zeitschrift , 103* : 89-122.

Sedivy C. , Müller A., & 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 , 25* : 718-725.

Simal J., Huidobro J.F., Muniategui S. (1988). Estudio de la fraccion esterolica de polen apicola. *Grasas Aceites*, *39* (6) : 327-333

Small, E., Jurzysta M., Nozzolillo C. (1990). The evolution of hemolytic saponin content in wild and cultivated alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae). *Economic Botany, 44* (2) : 226-235

Somme L., Vanderplanck M., Michez D. , Lombaerde I., Moerman R., Wathelet B., et al. (2013). Does pollen and nectar quality influence bumble bee flower constancy on *Comarum palustre* and co-occuring plant species? *in press*.

Soucy S. L. (2002, Janvier). Nesting Biology and Socially Polymorphic Behavior of the Sweat Bee *Halictus rubicundus* (Hymenoptera: Halictidae). *Annals of the Entomological Society of America , 95* (1) : 57-65.

Steiner K., & Whitehead V. B. (1990). Pollinator adaptation to oil-secreting flowers - *Rediviva* and *Diasca*. *Evolution , 44* : 1701-1707.

Steiner K., & Whitehead V. B. (1991). Oil flowers and oil bees: further evidence for pollination adaptation. *Evolution , 45* : 1493-1501.

Strickler K. (1979). Specialization and foraging efficiency of solitary bees. *Ecology , 60* : 998-1009.

Svoboda J.A., Thompson M.J., Robbins W.E., & Kaplanis J.N. (1978). Insect Steroid Metabolism. *Lipids , 13* (10) : 742-753.

Svoboda J.A., Herbert E.W., Lusby W.R., & Thompson M.J. (1983). comparaison of sterols of pollens, honeybee workers, and prepupae from field sites. *Arch. Insect Biochem Physiol , 1* : 25-31.

Svoboda J.A., Herbert E.W., Thompson M.J., & Feldlaufer M.F. (1986). Selective Sterol Transfer in the Honey Bee: Its significance and Relationship to Other Hymenoptera. *Lipids , 21* (1) : 97-101.

Tasei J.-N., & Aupinel P. (2008). Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie , 39* : 397-409.

Timmermann K., & Kuhlmann M. (2008). The biology of a Patellapis (s. str.) species (Hymenoptera: Apoidea: Halictidae): sociality described for the firdt time in this bee genus. *Apidologie , 39* : 187-197.

Tirgari S. (1968). Le choix du site de nidification par *Melitta leporina* (Panz.), Hym. Melittidae et *Melitta clavicornis* (Latr), Hym. Andrenidae. *Annales de l'Abeille , 11* (2) : 79-103.

Thorp R.W. (2000). The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution , 222* : 211-223.

Vanderplanck M. (2009). Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires spécialistes sur saule. travail de fin d'études, UMONS.

Vanderplanck M., Bruneau E., & 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 , 3* : 23-27.

Vanderplanck M., Michez D., Vancraenenbroeck S., & Lognay G. (2011). Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical letters , 44* : 1807–1820.

Vanderplanck M., Vereecken N.J., Lognay G., Wathelet B., Wattiez R. and Michez D. Evolution of host-plant choice in bees : the constraint hypothesis of chemical filters. Unpublished manuscript, in perparation

Vanderplanck M. (2013). How does physiology interface with ecology? Dietetic constraint in host-plant choices of bees. Thèse de doctorat, UMONS, Zoologie.

Vereecken N., Toffin E., Gosselin M., & Michez D. (2006). Observation relatives à la biologie et à la nidification de quelques abeilles sauvages psammophiles d'intérêt en Wallonie. 1. Observations printanières. *Parcs & Réserves , 61* (1) : 8-13.

Vereecken N., Toffin E., & Michez D. (2006). Observation relatives à la biologie et à la nidification de quelques abeilles sauvages psammophiles d'intérêt en Wallonie. 2. Observations estivales et automnales. *Parcs & Réserves , 61* (4) : 12-20.

Vereecken N., Schwenniger H., Gogala A., & Roberts S. PM. (2009). Mise à jour de la distribution de l'abeille du lierr, *Colletes hederae* Schmidt & Westrich (Hymenoptera, Colletidae) en Europe. *OSMIA , 3* : 2-3.

Weiner C. N. , Hilpert A., Werner M., Linsenmair K. E., & Blüthgen N. (2010). Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie , 41* : 476-487.

Westerkamp C. (1996). Pollen in bee-flower relations. Some considerations on melittophily. *Botanica Acta , 109* : 325-332.

Westrich P. (1989). Die Wildbienen Baden-Württembergs. Eugen Ulmer, Suttgart, Germany.

Winston M. (1987). The Biology of the Honey Bee. 281pp.

8. ANNEXES

8.1. ANNEXES I : biosynthèses des stérols chez les plantes

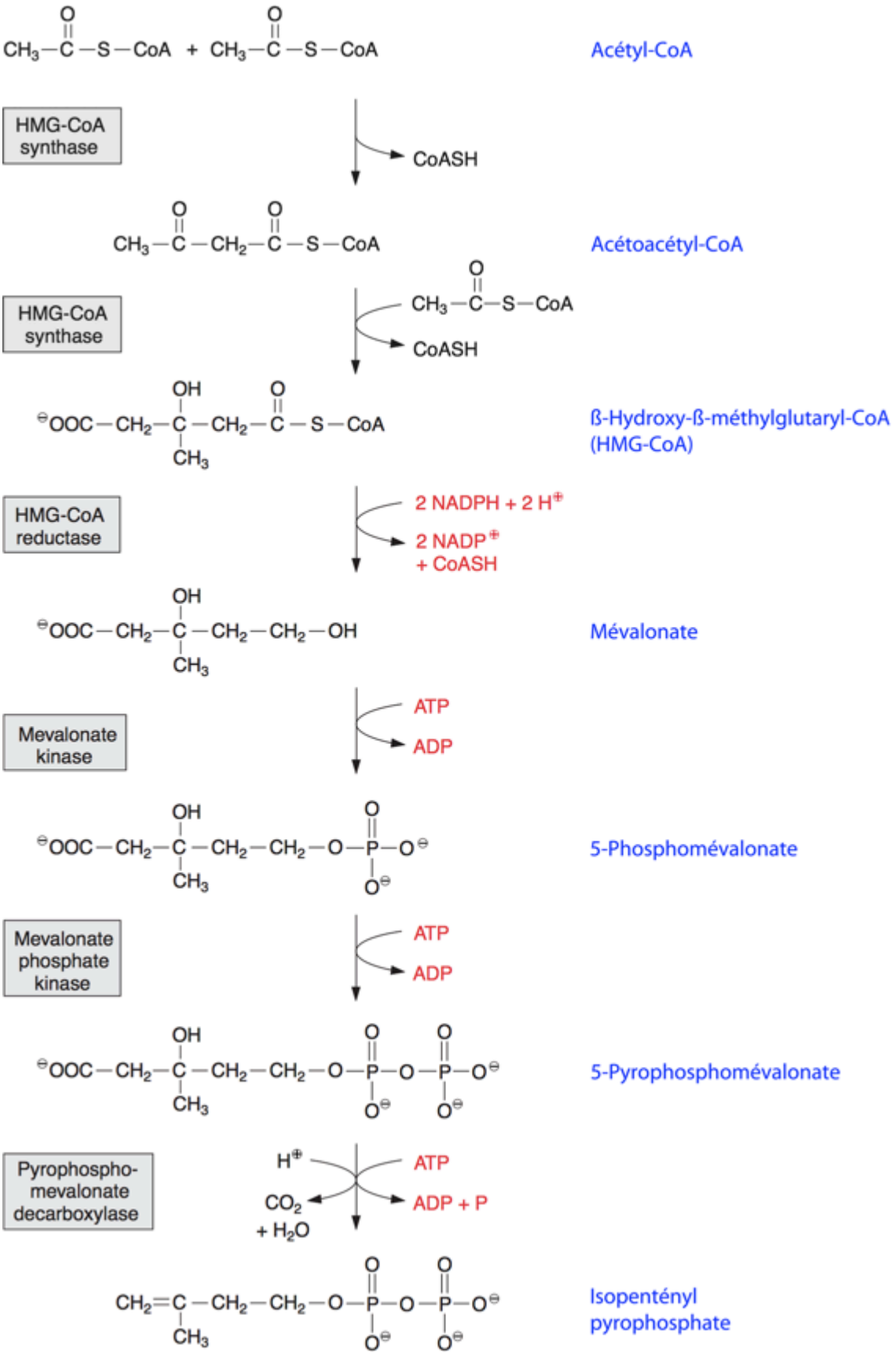


Figure 33 : Synthèse de l'isopentényl pyrophosphate dans le cytosol via la voie de l'acide mévalonique. D'après Heldt, 2005 ; modifié (P.-L. Zerck).

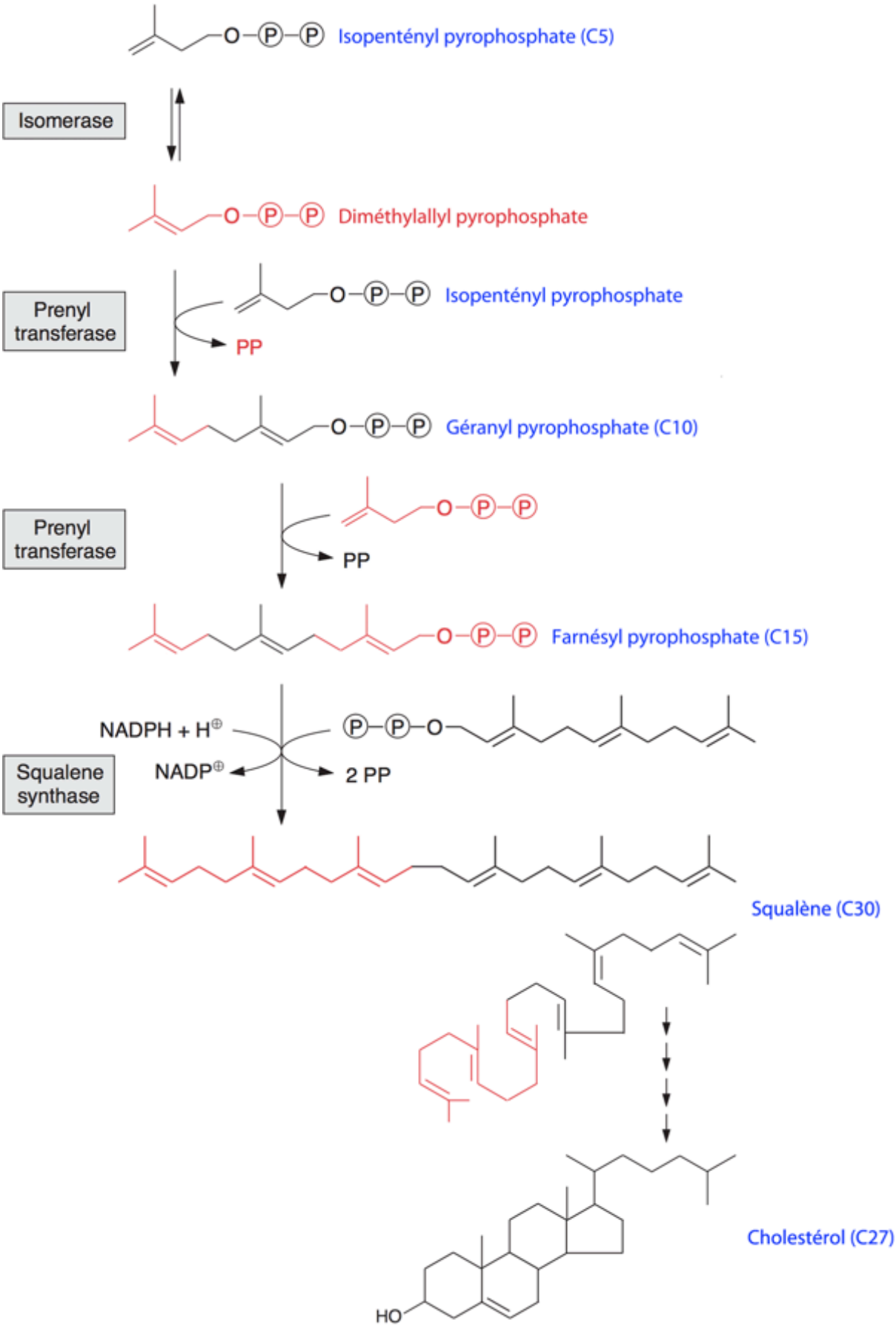


Figure 34 : Formation de cholestérol à partir de l'isopentényl pyrophosphate. Les multiples flèches entre le squalène et le cholestérol indiquent qu'une multitude d'étapes est nécessaire pour passer de l'un à l'autre. D'après Heldt, 2005 (modifié P.-L. Zerck).

8.2. ANNEXES II : Chromatogrammes représentatifs des échantillons modèles étudiés

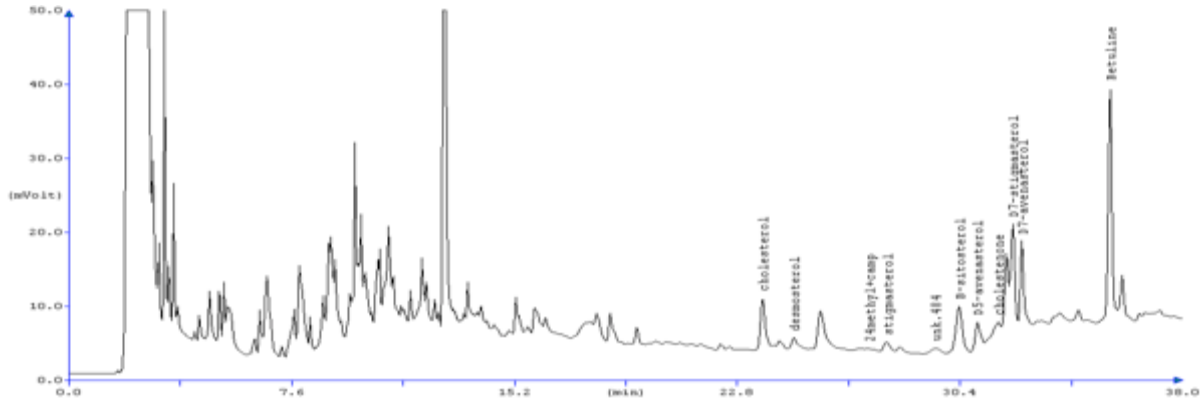


Figure 35: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen unifloral d'*Aster tripolium*, confectionnée par *Apis mellifera*

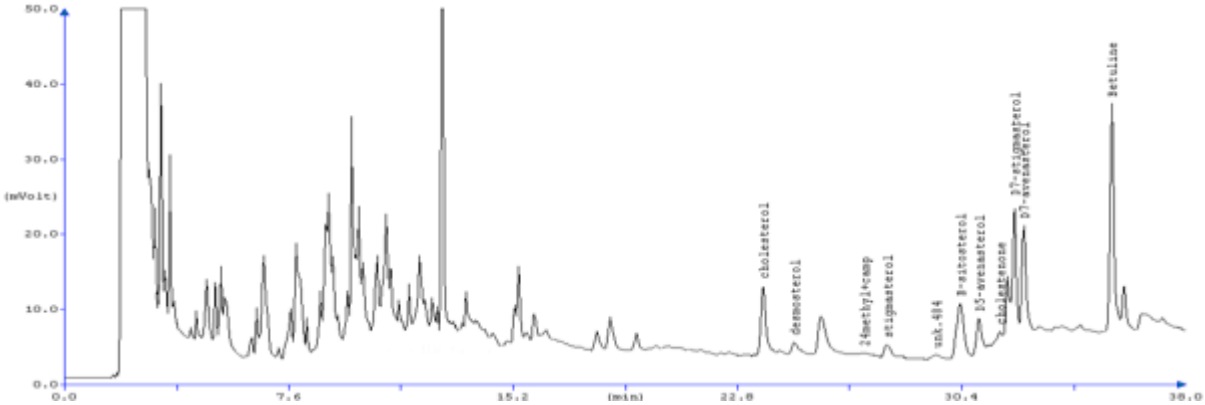


Figure 36: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale d'*Aster tripolium*, confectionnée par *Bombus terrestris*

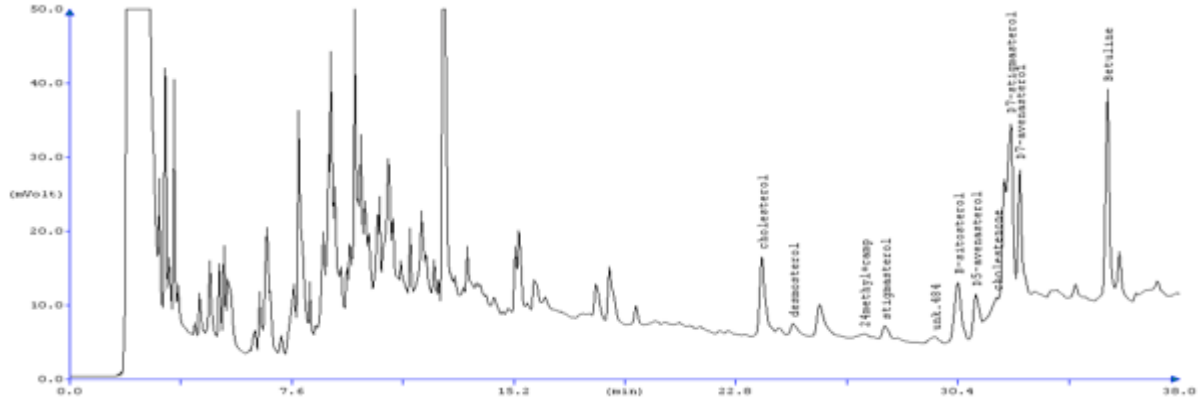


Figure 37: Chromatogramme d'un échantillon de charge scopale de *Colletes halophilus*

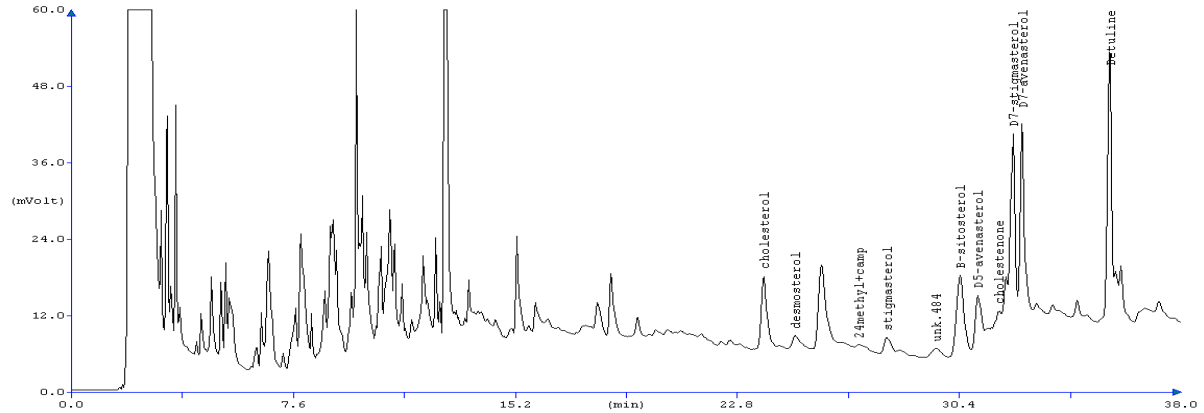


Figure 38: Chromatogramme d'un échantillon de pollen d'*Aster tripolium*

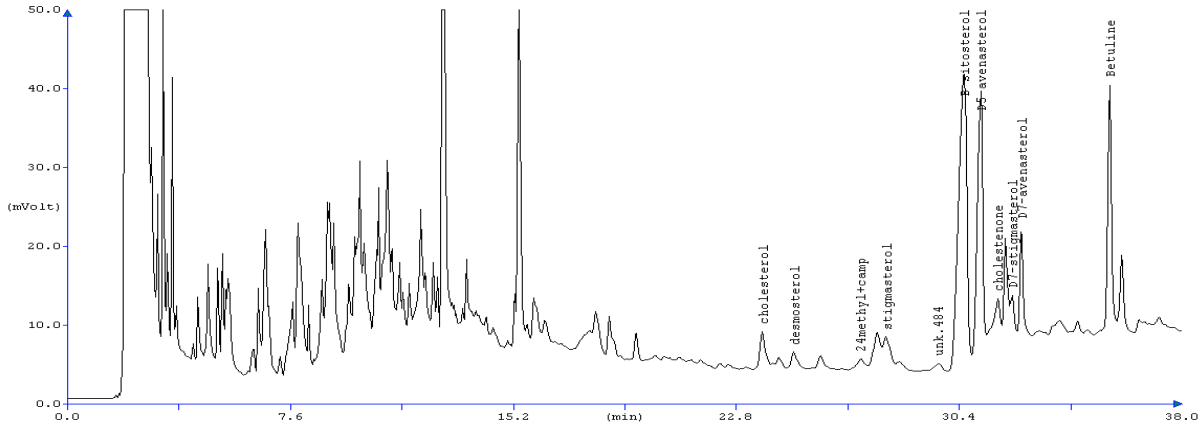


Figure 39: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Calluna vulgaris,* confectionnée par *Apis mellifera*

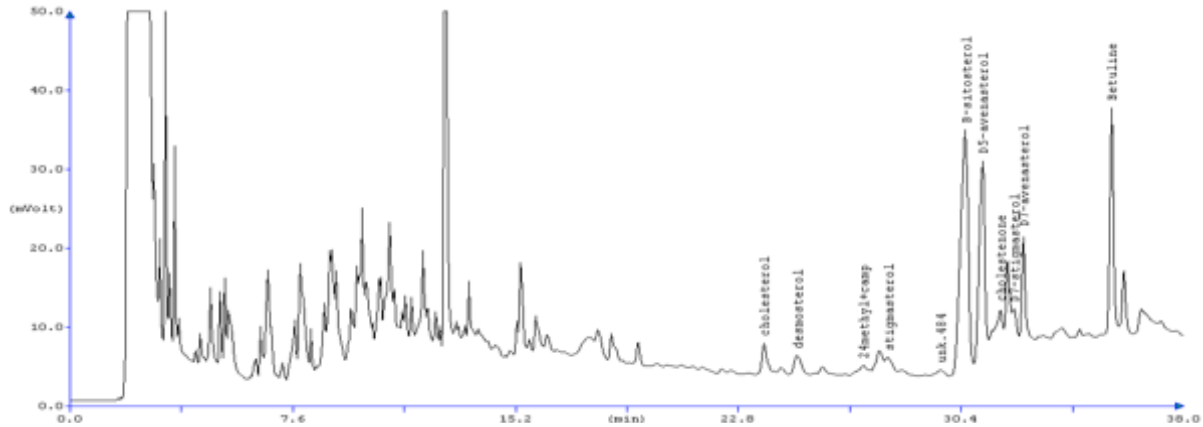


Figure 40: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Calluna vulgaris*, confectionnée par *Bombus terrestris*

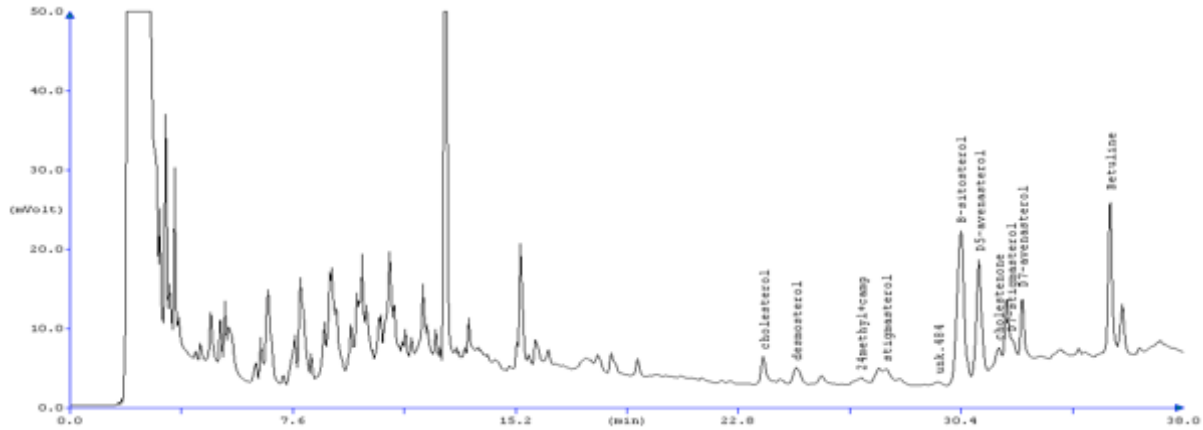


Figure 41: Chromatogramme d'un échantillon de charge scopale de *Colletes succinctus*

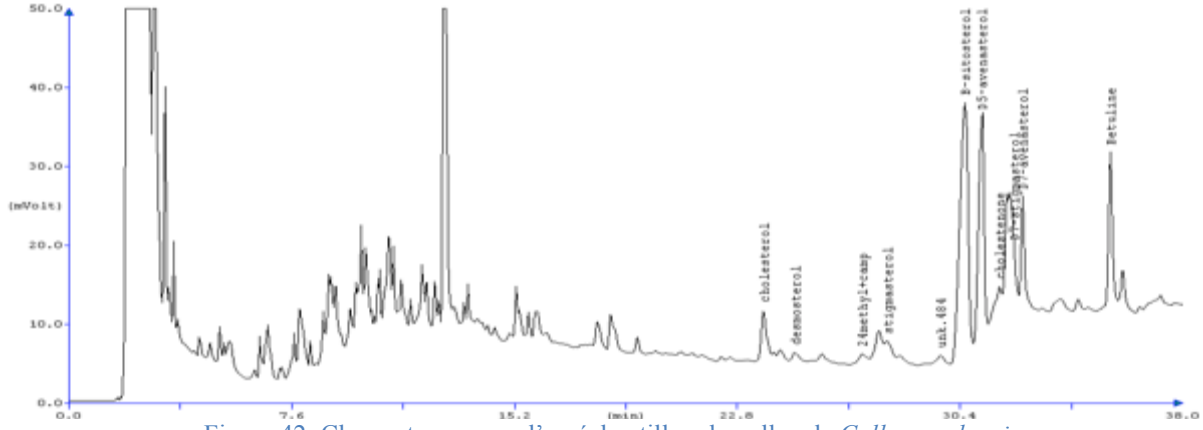


Figure 42: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Calluna vulgaris*

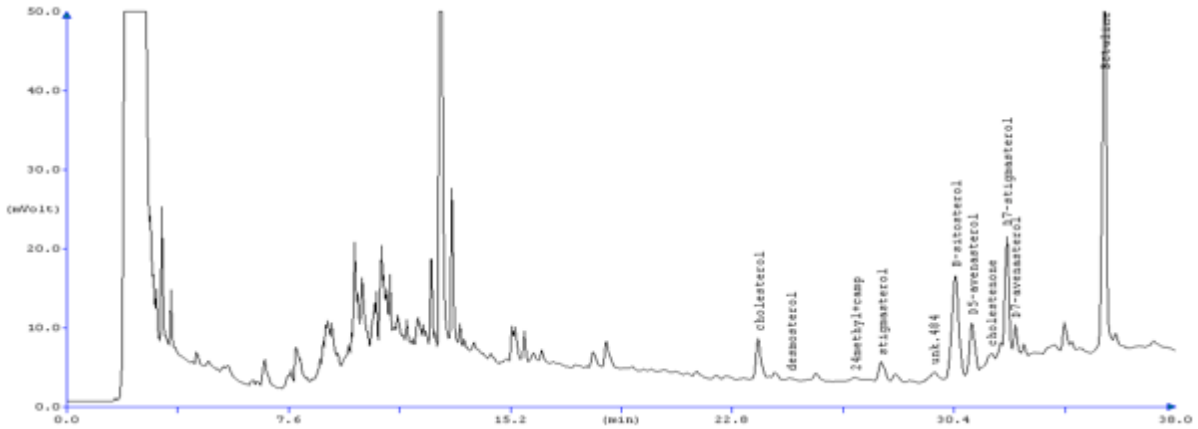


Figure 43: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Hedera helix*, confectionnée par *Apis mellifera*

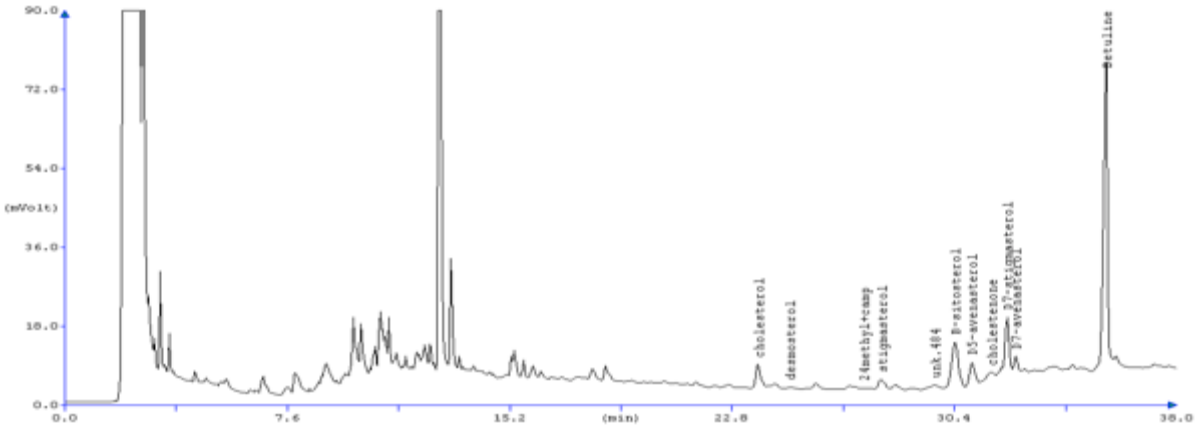


Figure 44: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Hedera helix*, confectionnée par *Bombus terrestris*

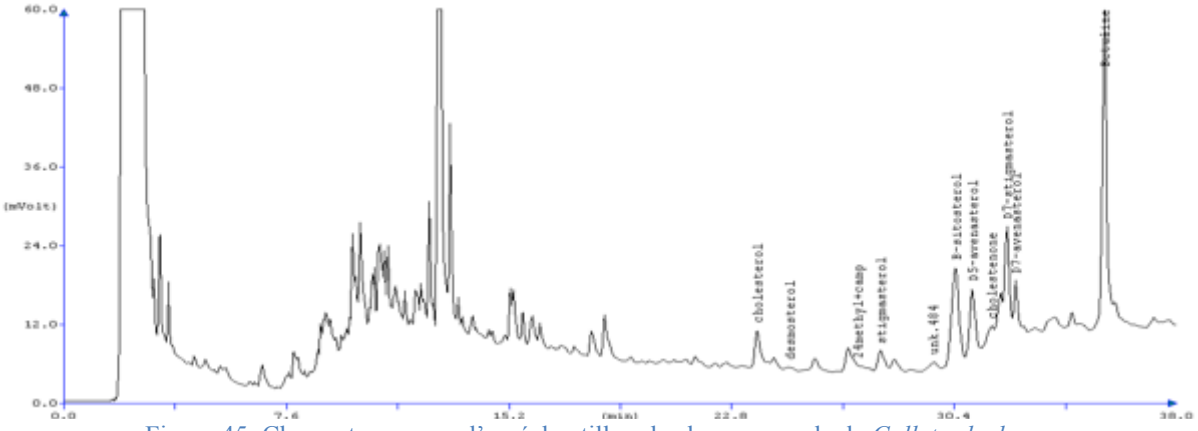


Figure 45: Chromatogramme d'un échantillon de charge scopale de *Colletes hederae*

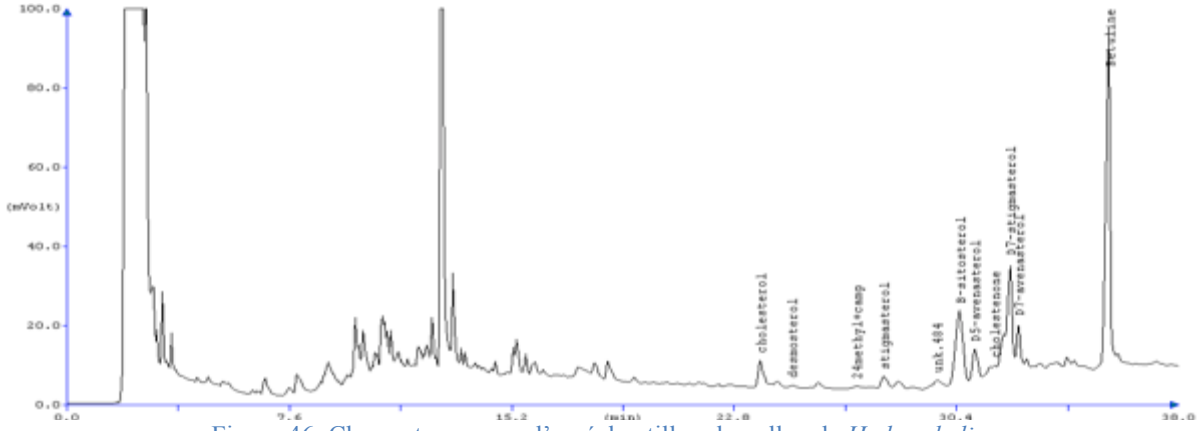


Figure 46: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Hedera helix*

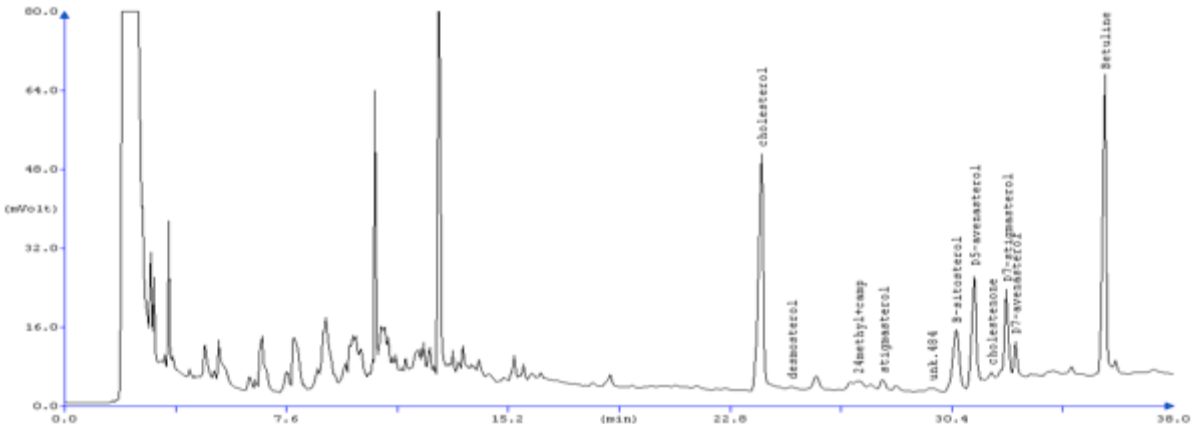


Figure 47: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Hypochaeris radicata*, confectionnée par *Apis mellifera*

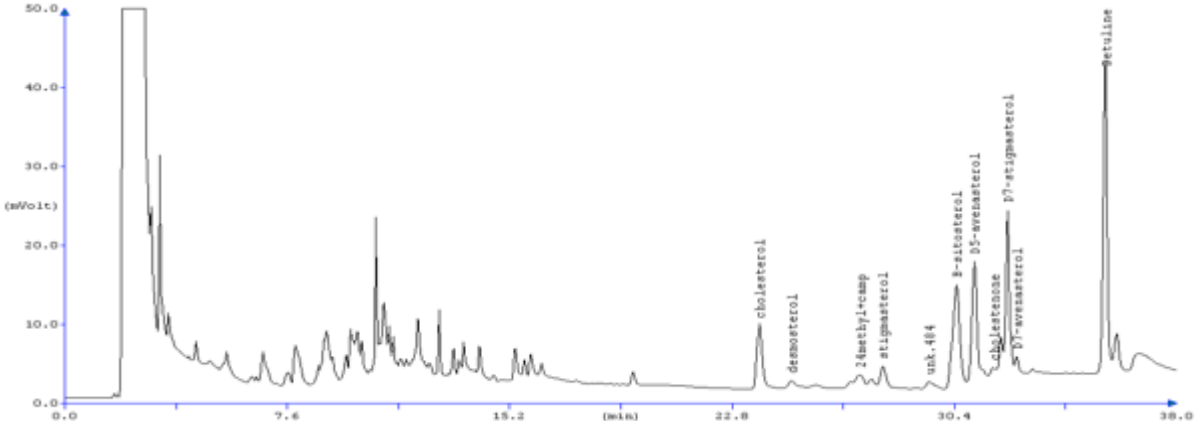


Figure 48: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Hypochaeris radicata*, confectionnée par *Bombus terrestris*

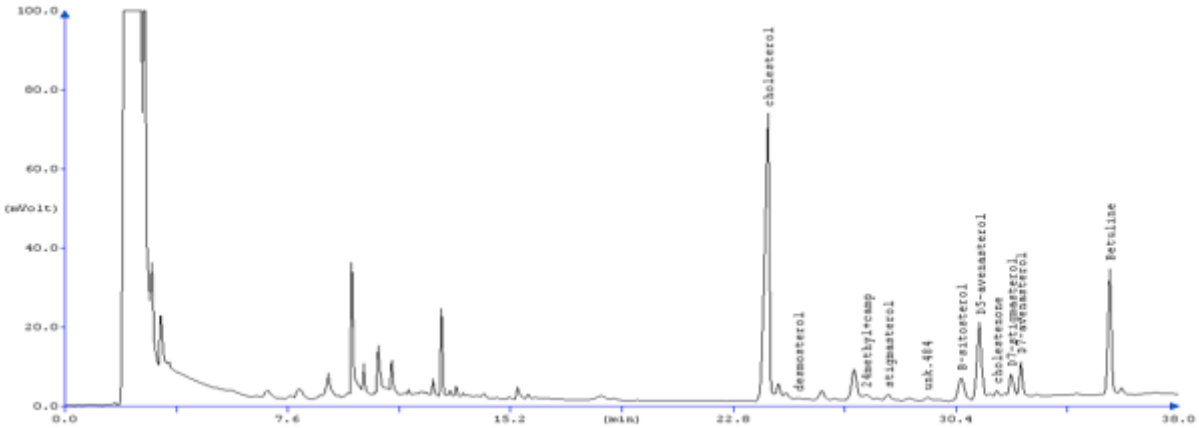


Figure 49: Chromatogramme d'un échantillon de charge scopale de *Dasypoda hirtipes*

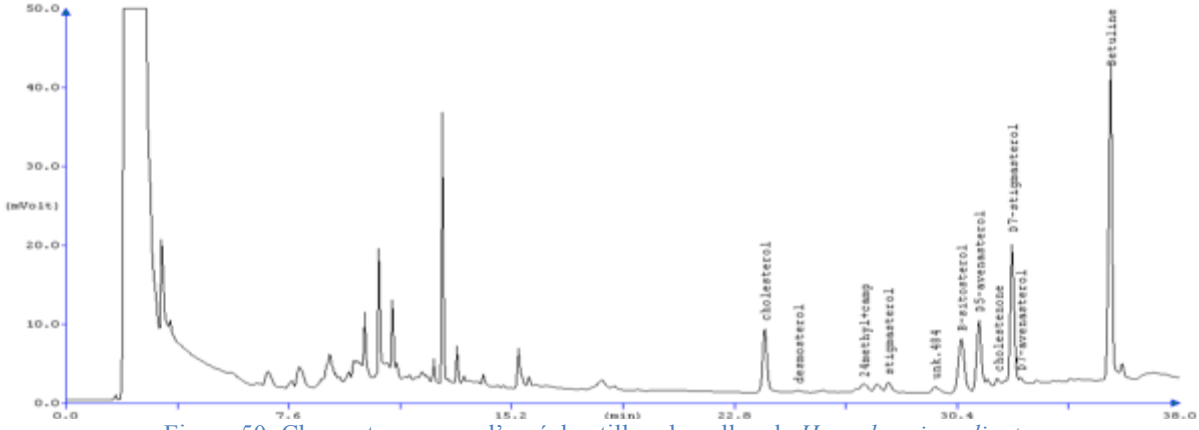


Figure 50: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Hypochaeris radicata*

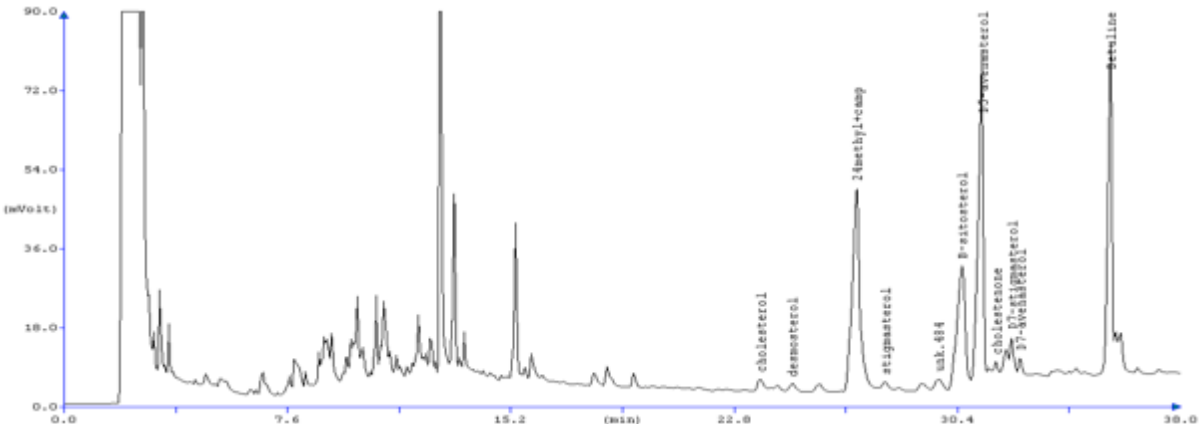


Figure 51: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Lythrum salicaria*, confectionnée par *Apis mellifera*

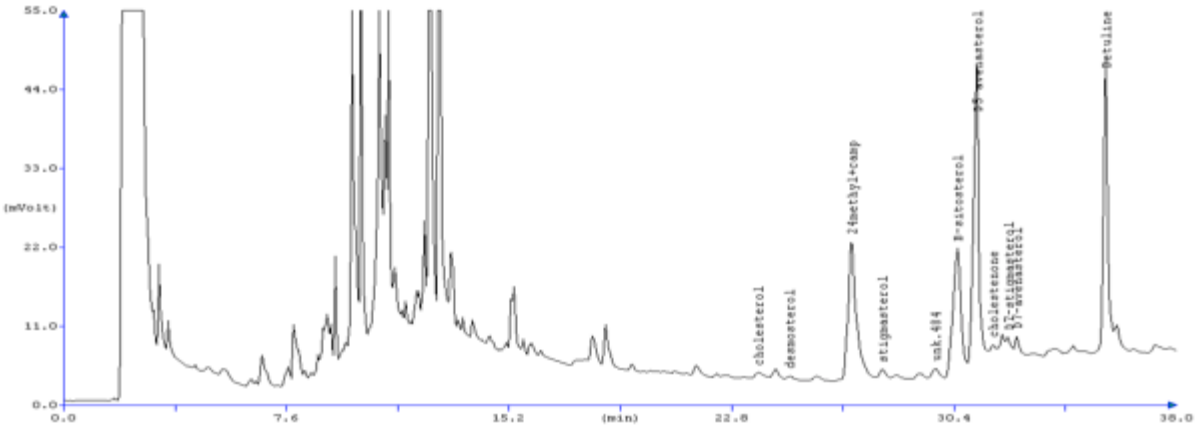


Figure 52: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Lythrum salicaria*, confectionnée par *Bombus terrestris*

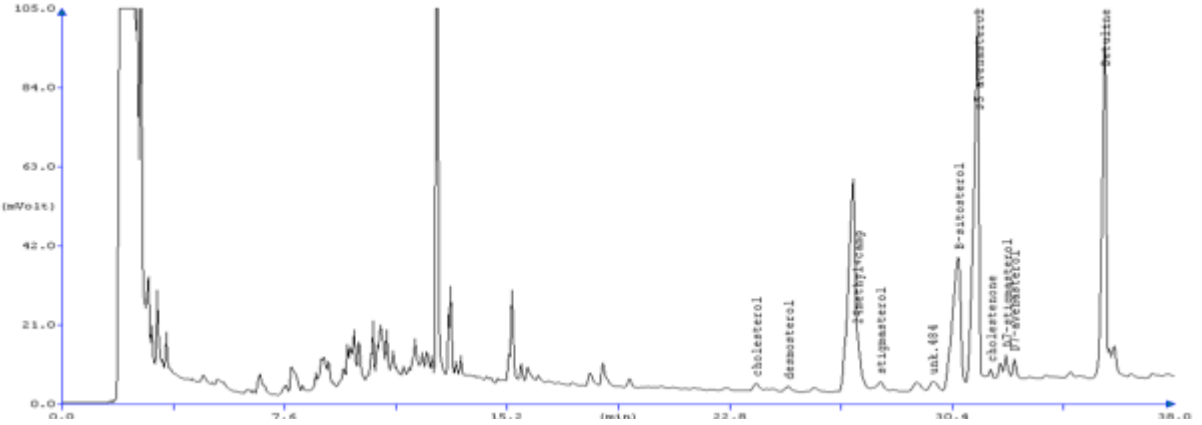


Figure 53: Chromatogramme de la charge scopale de *Melitta nigricans*

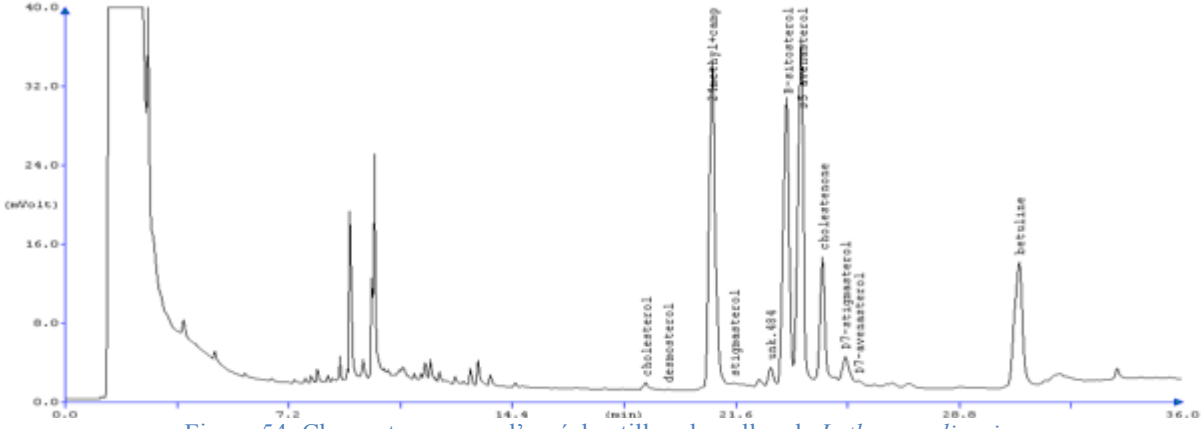


Figure 54: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Lythrum salicaria*

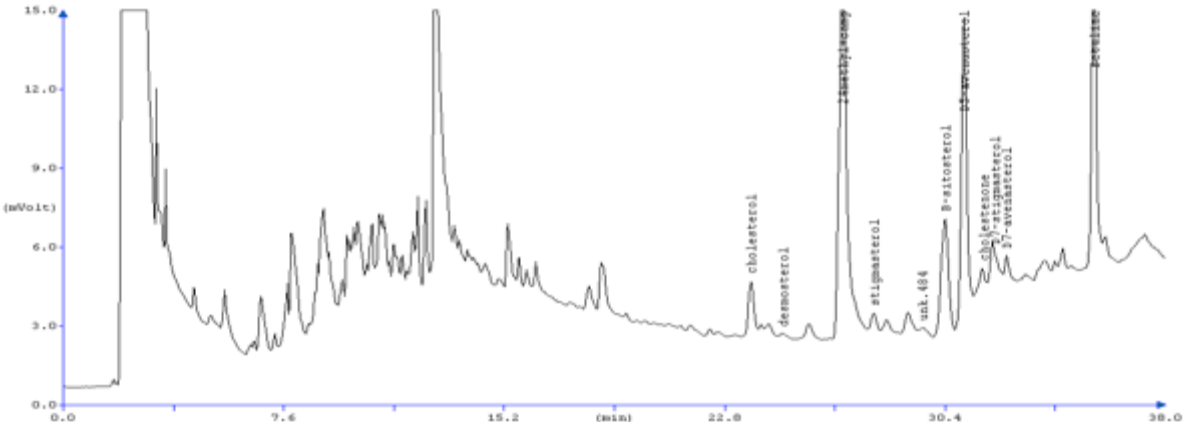


Figure 55: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Medicago sativa*, confectionnée par *Apis mellifera*

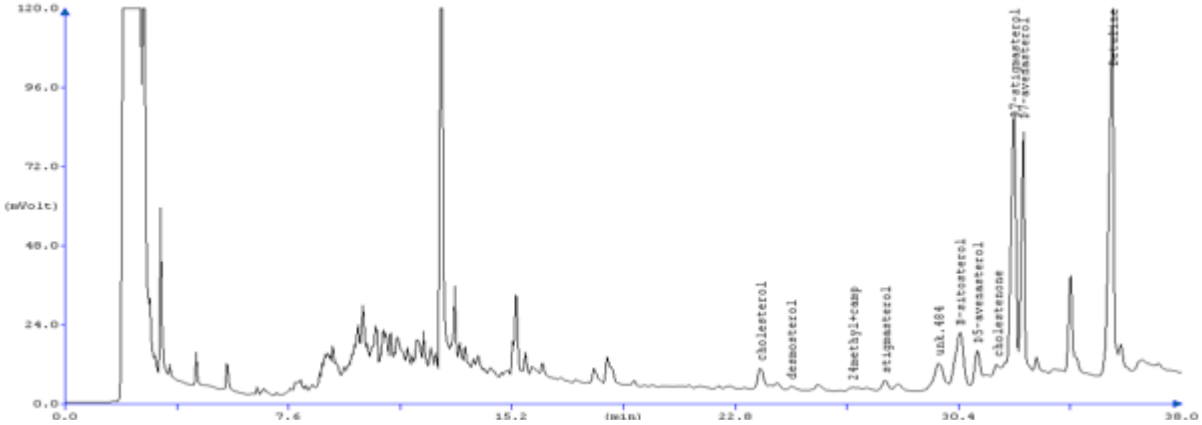


Figure 56: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Medicago sativa*, confectionnée par *Bombus terrestris*

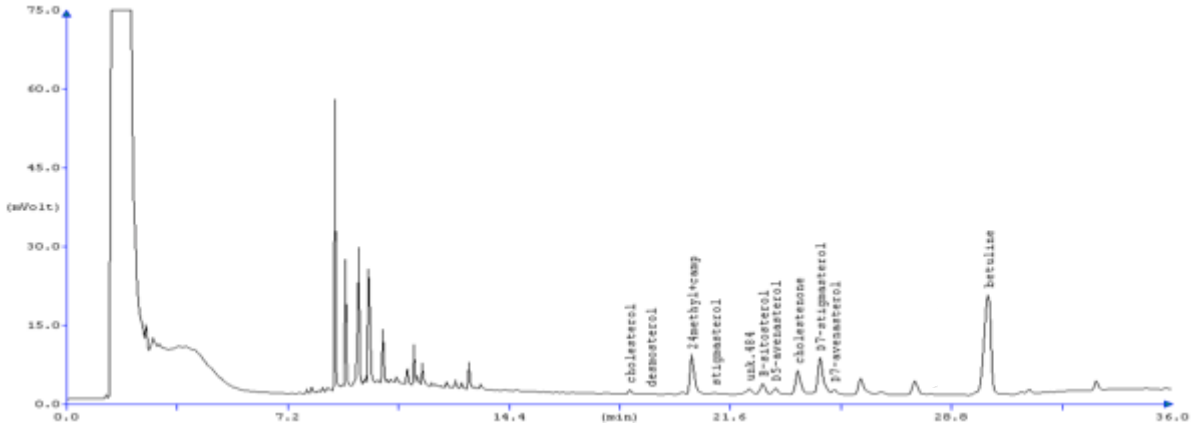


Figure 57 : Chromatogramme d'un échantillon de charge scopale de *Melitta leporina*

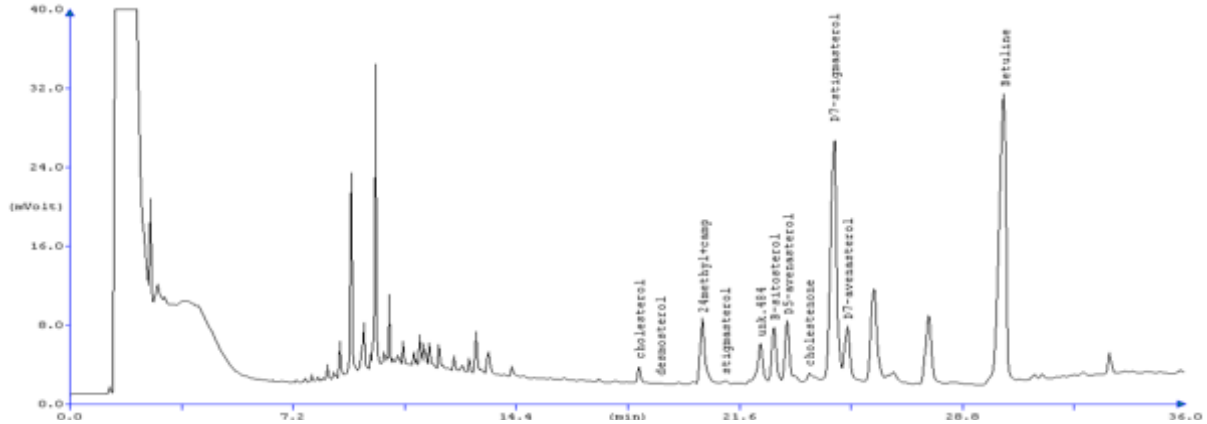


Figure 58: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Medicago sativa*

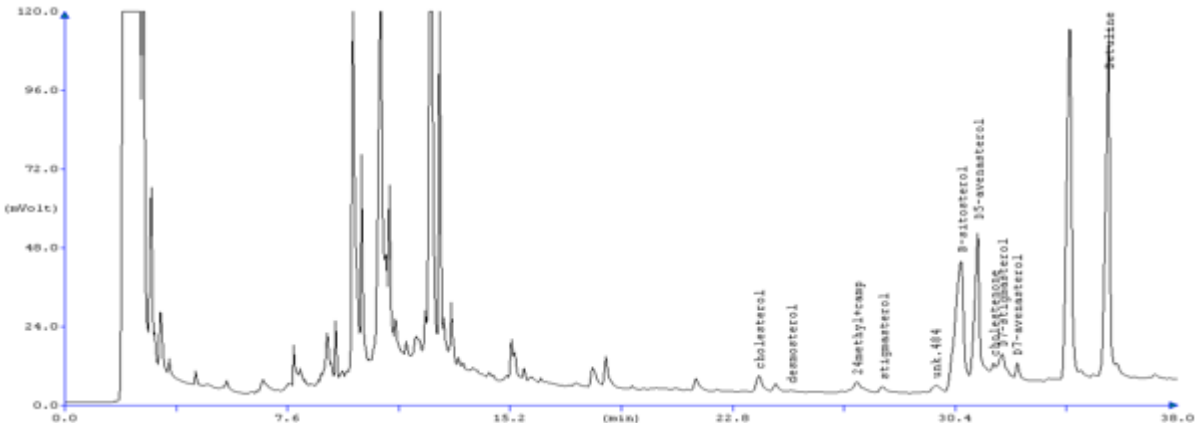


Figure 59: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Salix caprea*, confectionnée par *Apis mellifera*

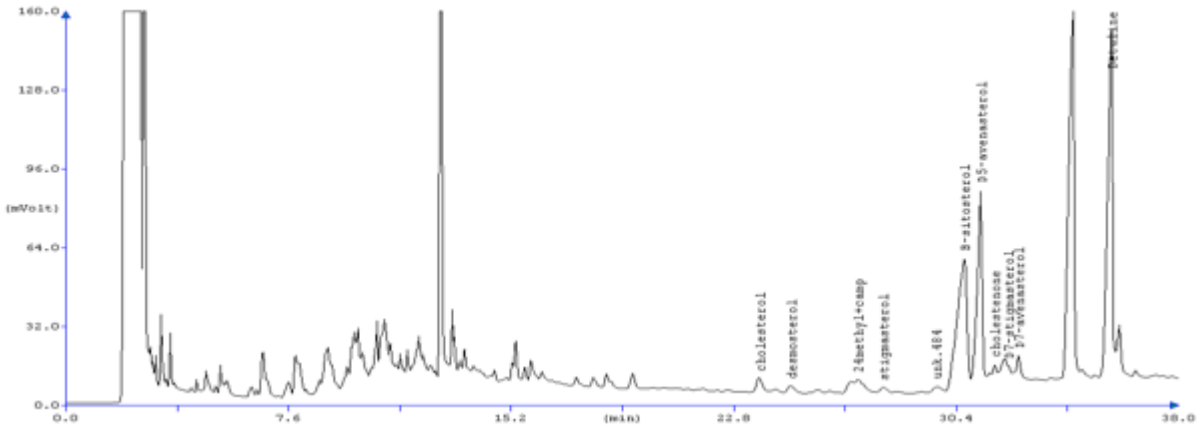


Figure 60: Chromatogramme d'un échantillon de pelote de pollen uniflorale de *Salix caprea*, confectionnée par *Bombus terrestris*

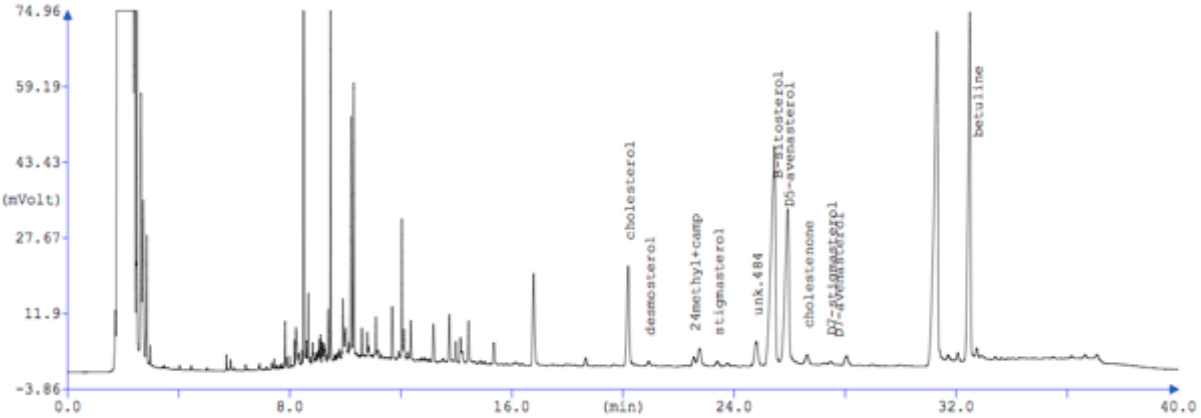


Figure 61: Chromatogramme d'un échentillon de charge scopale d'*Andrena vaga*

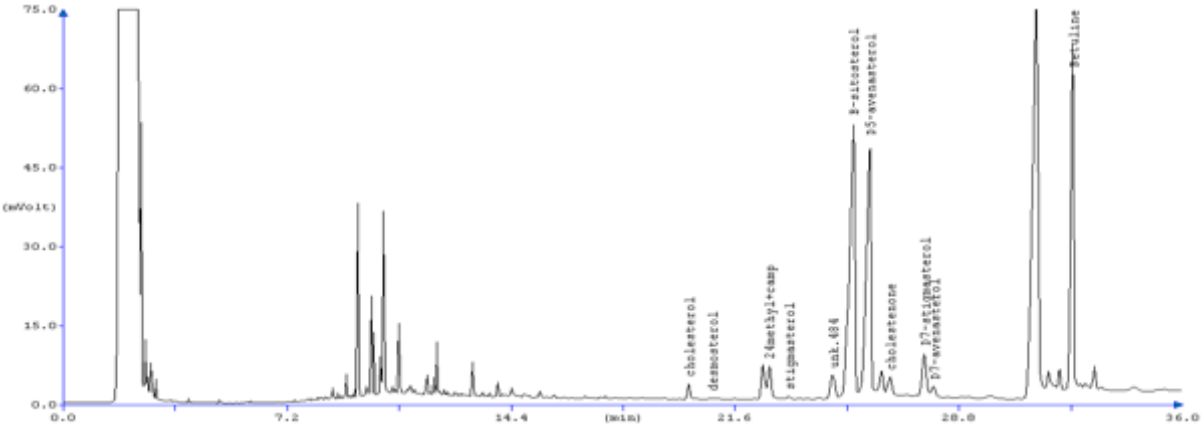


Figure 62: Chromatogramme d'un échantillon de pollen de *Salix caprea*