

UNIVERSITÉ DE MONS-HAINAUT

FACULTÉ DES SCIENCES

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Electro-antennographie de reines  
vierges de *Bombus terrestris* (L.)  
(Hymenoptera, Apidae) vaporisées par  
des sécrétions des glandes labiales  
céphaliques mâles

Directeur de mémoire  
Prof. Pierre Rasmont

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

Année académique 2006-2007



**M. Gorez, 2007.** *Electro-antennographie sur des reines vierges de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae) vaporisées par des sécrétions des glandes labiales céphaliques.* Mémoire de Fin d'Etudes en Sciences biologiques, Université de Mons-Hainaut, Mons, 6+67 p.

**Résumé:** Les reines de bourdons reconnaissent les mâles conspécifiques par les sécrétions des glandes labiales céphaliques (GLC). Le but du présent travail est d'identifier les molécules du bouquet phéromonal des GLC des mâles qui déclenchent un stimulus olfactif chez la femelle vierge de *Bombus terrestris* et de mettre en évidence une éventuelle variabilité subsppécifique. Afin d'y parvenir, 2 sous-espèces de *Bombus terrestris* sont étudiées: *B. terrestris dalmatinus* et *B. terrestris canariensis*. Les sécrétions des GLC des mâles sont analysées à l'aide d'un GC et simultanément vaporisées sur les antennes des reines dont l'activité neuronale est enregistrée par un électro-antennographe. Un premier protocole est basé sur l'utilisation de reines entières immobilisées dans la pâte à modeler. Un second est basé sur l'utilisation des seules antennes fraîchement coupées. Les bouquets phéromonaux des 2 sous-espèces sont testés au moyen de ces 2 protocoles et les réponses engendrées sont comparées.

Une grande variabilité individuelle des réponses est observée. Les reines de *B. terrestris dalmatinus* réagissent plutôt aux sécrétions non-consppécifiques, alors que les reines de *B. terrestris canariensis* ont une réaction supérieure aux phéromones consppécifiques. De petites variations génétiques interpopulationnelles sont peut-être la cause d'une différence de composition phéromonale entre ces 2 sous-espèces.

Les résultats portent à croire que les 2 taxons étudiés ont une composition de leur sécrétion des GLC qui diffère au point d'engendrer des réactions différentes.

**Mots clés:** *Bombus terrestris*, notion d'espèce, électro-antennographie, glandes labiales céphaliques.

## Remerciements

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

Je remercie tout particulièrement le Professeur P. Rasmont, pour m'avoir accueilli dans son service, pour ses conseils judicieux et sa constante attention.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté de participer à l'évaluation de ce travail et que j'ai l'honneur de citer: le Dr. L. Ris, le Dr. M. Terzo et M. F. Verheggen.

Je remercie le Prof. E. Haubruge pour l'accueil dans son laboratoire d'entomologie fonctionnelle et évolutive (FUSAGx, Gembloux).

Je tiens à remercier le Prof. I. Valterová et le Dr. B. Kalinová pour l'accueil dans leur laboratoire (IOCB, Prague, République Tchèque).

Un tout grand merci à M. F. Verheggen pour l'aide qu'il m'a apportée lors de la mise en place des protocoles expérimentaux.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Mlle A. Coppée, Mme S. Iserbyt et le Dr. M. Terzo pour m'avoir aiguillée et aidée à la réalisation de ce mémoire.

J'adresse un remerciement au Prof. R. Muller et au Dr. P. Gerbaux (UMH) pour m'avoir permis d'employer leur matériel.

Je remercie la firme Biobest pour la fourniture de matériel biologique.

Que tous ceux qui m'ont aidé lors des différentes expérimentations reçoivent ici toute ma gratitude. Je pense en particulier à T. Mathy et A.-S. Popeler.

Je remercie M. A. Chorein, M. D. Michez et M. T. De Meulemeester pour leur soutien et les services rendus.

J'adresse enfin mes remerciements à ma famille et à mes amis pour m'avoir aidé et soutenu tout au long de l'année.

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



# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1.1. LA NOTION D'ESPÈCE.....	1
1.2. LA SPÉCIATION.....	1
1.3. LE SMRS DES BOURDONS.....	2
1.4. PHÉROMONES.....	3
1.4.1. Définition.....	3
1.4.2. Volatilité.....	3
1.4.3. Classification.....	3
1.4.4. Les phéromones nuptiales.....	4
1.4.5. Sécrétions.....	4
1.5. MODÈLE BIOLOGIQUE.....	5
1.6. GLANDES LABIALES CÉPHALIQUES.....	7
1.7. OLFACION.....	8
1.7.1. Définition.....	8
1.7.2. Rôle.....	9
1.7.3. Perception.....	9
1.7.4. Transduction du signal olfactif.....	9
1.7.5. Intégration de l'information.....	10
.....	13
1.8. CHÉMOTAXONOMIE.....	13
1.9. OBJECTIFS.....	14
<b>2. MATERIEL ET METHODE.....</b>	<b>15</b>
2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.....	15
2.2. PRÉPARATION DES GLANDES CÉPHALIQUES LABIALES.....	16
2.2.1. Technique de dissection.....	16
2.2.2. Conservation des glandes.....	17
2.2.3. Préparation des solutions.....	17
2.3. ELECTRO-ANTENNOGRAPHIE.....	17
2.3.1. Electro-antennographie sur reine entière.....	17
2.3.2. Electro-antennographie sur antenne.....	22
2.3.3. Le chromatographe en phase gazeuse couplé à l'électro-antennographe.....	24
2.4. ANALYSE DES DONNÉES.....	27
2.4.1 Mesures.....	27
.....	27
1                    2                    3                    4                    (a).....	27
(b).....	27
2.4.2. Analyse statistique.....	28
<b>3. RÉSULTATS.....</b>	<b>28</b>
3.1. EAG.....	28
3.1.1. EAG sur reine entière.....	28
3.1.2. EAG sur antenne.....	35
3.2. GC-EAD.....	40
3.2.1. GC-EAD sur reine entière.....	40
3.2.2. GC-EAD sur antenne.....	40
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>42</b>
4.1. ELECTRO-ANTENNOGRAMMES.....	42
4.2. ANALYSES STATISTIQUES.....	43
4.3. GC-EAD.....	45
4.4. CHOIX DE LA MÉTHODE DE TRAVAIL.....	45
4.5. INTRA- ET INTER-SPÉCIFICITÉ.....	46
4.5.1. Notion d'espèce et de sous-espèce.....	46
4.5.2. Distance génétique entre <i>B. t. dalmatinus</i> et <i>B. t. canariensis</i> .....	48

<b>5. CONCLUSION.....</b>	<b>51</b>
<b>6. PERSPECTIVES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>52</b>
<b>8. ANNEXES.....</b>	<b>57</b>
8.1. ELECTRO-ANTENNOGRAMMES DES REINES DE <b>BOMBUS TERRESTRIS DALMATINUS</b> .....	57
8.2. ELECTRO-ANTENNOGRAMMES DES REINES DE <b>BOMBUS TERRESTRIS CANARIENSIS</b> .....	60
.....	60
8.3. ELECTRO-ANTENNOGRAMMES DE L'ANTENNE DES REINES DE <b>BOMBUS TERRESTRIS DALMATINUS</b> .....	63
8.4. ELECTRO-ANTENNOGRAMMES DE L'ANTENNE DES REINES DE <b>BOMBUS TERRESTRIS CANARIENSIS</b> .....	65





## 1. Introduction

### 1.1. La notion d'espèce

Les définitions d'espèce et de sous-espèce sont parfois confuses. La notion d'espèce a beaucoup évolué au travers des époques.

Tout d'abord, la notion d'espèce a été typologique. Depuis l'époque de Linné l'espèce définie est en première approximation reconnue comme l'ensemble des individus qui ressemblent au type. Le type est un spécimen de référence décrit dans une publication et déposé dans un musée.

Le concept d'espèce biologique a surtout été développé par Mayr (1963). Les trois aspects importants dans cette définition de l'espèce sont les suivants:

- les espèces sont définies par leurs caractéristiques plutôt que par leurs différences;
- les espèces consistent en des populations plutôt qu'en des individus non-connectés isolés;
- les espèces sont davantage définies par les relations entre populations non-conspécifiques plutôt que par des relations entre individus conspécifiques.

La troisième caractéristique donnée par Mayr (1963) est très discutée. Au cours de leur parade nuptiale, les individus concentrent leurs recherches sur les membres appartenant à leur espèce et négligent totalement les individus d'autres espèces.

De plus, il définit l'espèce comme l'ensemble des individus capables d'engendrer une descendance fertile. Selon cette définition, des individus morphologiquement différents ou avec une parade nuptiale différente qui s'accouplent, appartiennent à une même espèce. Or ce critère présente d'innombrables exceptions.

En réponse à ces objections, la définition d'une espèce la plus récente et la plus opérationnelle, est celle de Paterson (1985, 1993). Paterson voit l'espèce comme l'ensemble des individus qui présentent un même système de recherche et de reconnaissance d'un partenaire sexuel potentiel. Ces individus d'une même espèce partagent des comportements tels que la recherche d'un conjoint, la parade nuptiale et l'accouplement. L'ensemble de ces messages constitue le « Species Mate Recognition System » (SMRS). Les sous-espèces appartiennent à une même espèce. Ce sont des populations distinctes génétiquement et géographiquement isolées mais qui peuvent s'accoupler aux zones de contact des distributions (Wilson & Brown, 1953) et qui de ce fait partagent le même SMRS.

### 1.2. La spéciation

L'apparition de nouvelles espèces vivantes est due à un processus évolutif appelé la spéciation. Dans ce processus, la dérive génique ainsi que les sélections naturelle et sexuelle, moteurs de l'évolution, ont un rôle important. L'apparition d'une nouvelle espèce, n'est pas un événement soudain qui survient simultanément à une mutation et qui aboutit à un individu d'un nouveau type. Une espèce consiste en plusieurs populations, elles-mêmes composées d'individus plus ou moins nombreux. Lorsque des populations interfécondes, d'une même espèce deviennent non-interfécondes, les deux espèces sont séparées: c'est le phénomène de spéciation.

### 1.3. Le SMRS des bourdons

De nombreuses espèces de bourdons ont un comportement nuptial de marquage et de patrouille (Haas, 1949; Cederberg *et al.*, 1984.). Les mâles effectuent un circuit nuptial le long duquel ils s'arrêtent sur différents objets tels que des feuilles, des brindilles, des troncs d'arbre à différentes hauteurs. Les objets choisis sont marqués par la sécrétion des glandes labiales céphaliques (ou GLC), (Hovorka *et al.*, 1998; fig. 1).

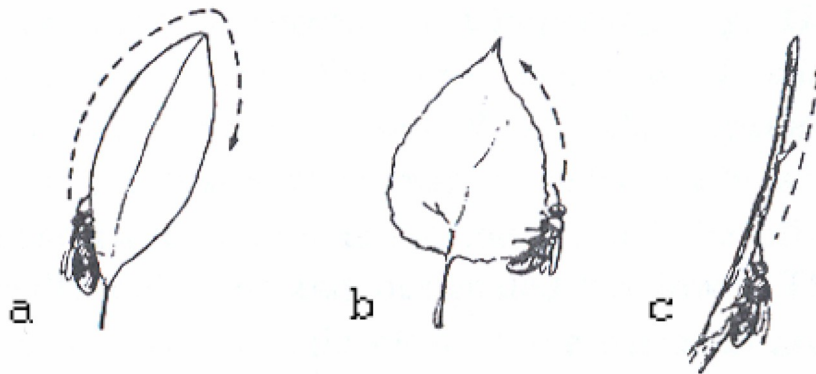


Figure 1. Comportement de marquage d'un mâle de *Bombus lapponicus* (Fabricius): (a) sur une feuille de *Salix glauca* L., (b) sur une feuille de *Betula tortuosa* L., et (c) sur une branche sèche de *Betula nana* L. (d'après Svensson, 1979).

Le mâle marque son circuit le matin. Il passe ensuite le reste de la journée à patrouiller le long du circuit. Si une femelle est posée sur une de ses marques, il la repère et entre en contact avec elle (Haas, 1949; Haas, 1967; Bergman, 1997).

Les modalités de ce comportement sont très spécifiques (Ågren *et al.*, 1979; Svensson, 1979) (fig. 2).

Au-delà de la configuration spécifique du circuit, le marquage phéromonal du mâle doit être spécifique afin de n'attirer que les reines de son espèce.

La spécificité du marquage implique une composition moléculaire particulière des phéromones nuptiales. Cette composition n'est pas constante. Elle varie par la combinaison

des composés, mais aussi par la concentration relative de chacun d'eux (Bergström *et al.*, 1981; Terzo *et al.*, 2003)

Chaque espèce a donc son propre mélange typique (Terzo *et al.*, 2003). Les composés déposés durant le marquage sont probablement importants comme mécanisme de reconnaissance spécifique (Bergström *et al.*, 1985).

Les différences spécifiques dans la composition des phéromones nuptiales sont de précieux outils pour les études de taxonomie. Bergström (1980) et Bellés *et al.* (1987) ont montré que la composition de sécrétion phéromonale reflète en partie les approches phylogénétiques.

Svensson (1977), Bertsch (1997) et Rasmont *et al.* (2005) ont utilisé cet outil pour vérifier la validité d'espèces de bourdons de plusieurs sous-genre, respectivement *Pyrobombus*, *Bombus* et *Sibiricobombus*.

## 1.4. Phéromones

### 1.4.1. Définition

Une phéromone est un ensemble complexe de différentes molécules. Les composés et leur concentration relative définissent une phéromone. Le nombre de composés ou leur concentration peut varier d'un bouquet phéromonal à un autre. Un composé majeur peut ne pas avoir de rôle important. L'inverse est également vrai. Une phéromone se différencie d'une sécrétion par son rôle. En effet, seuls les composés qui induisent un changement du comportement sont considérés comme phéromones.

### 1.4.2. Volatilité

Les phéromones volatiles ont un poids moléculaire faible. Ce sont des composés linéaires à chaîne carbonée courte ( $< C_{18}$ ). Elles interviennent lors de communications à longue distance.

Les phéromones non volatiles présentent un poids moléculaire élevé. Leurs constituants sont des hydrocarbures ou des composés à chaîne carbonée longue ( $> C_{18}$ ). Elles entrent en jeu lors de communications à faible distance (Cassier *et al.*, 2000).

### 1.4.3. Classification

Les phéromones sont généralement séparées en deux catégories. Les effets de ces

deux catégories de phéromones s'appliquent à des temps différents (Larsson & Svensson, 2004).

La première catégorie est celle des « *primer pheromones* ». Ces phéromones causent des développements ou des réponses physiologiques à long terme (Larsson & Svensson, 2004). Leurs effets mènent à une nouvelle situation globale de la société ou de l'individu (Jackson & Morgan, 1993). Le manque de réponse immédiate évidente semble être une difficulté pour l'étude de ces phéromones.

La seconde catégorie regroupe les « *releaser pheromones* ». Elles interviennent dans les interactions individuelles. Ces phéromones causent un changement immédiat et réversible dans le comportement de l'individu récepteur (Jackson & Morgan, 1993).

Au sein de cette catégorie, on retrouve sept classes principales de phéromones.

Les phéromones:

- d'alarme;
- de piste;
- de marquage territorial;
- de reconnaissance interindividuelle;
- d'agrégation;
- d'espacement;
- d'activités nuptiales (Jackson & Morgan, 1993).

#### **1.4.4. Les phéromones nuptiales**

Cette étude concerne les phéromones nuptiales. Elles interviennent dans le processus de mise en contact des deux sexes. A l'issue d'une éventuelle rencontre, elles permettent de proposer un accouplement.

De nombreuses études ont permis d'éclaircir ce point de vue. Une grande partie des recherches liées à ce type de phéromones ont été accomplies sur des Lépidoptères (Cassier *et al.*, 2000; Nation, 2001).

#### **1.4.5. Sécrétions**

Les phéromones des insectes sont produites par des glandes exocrines. Elles varient de la simple glande unicellulaire individuelle à des agrégats cellulaires internes, élaborés et connectés à un réservoir (Percy-Cunningham & Mac Donald, 1987).



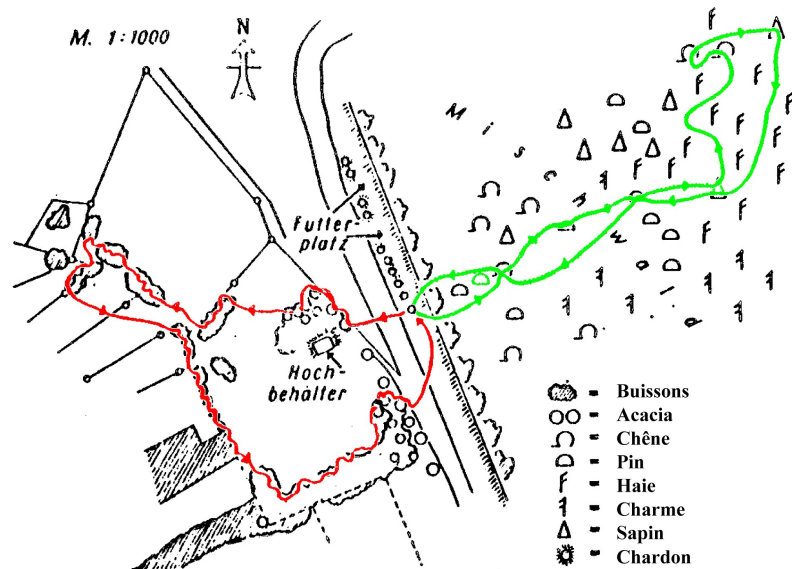


Figure 2. Schéma du circuit de patrouille de *Bombus cryptarum* en vert (à droite) et de *Bombus terrestris* en rouge (à gauche). Le 12 août à Baden, altitude de 150m (d'après Haas, 1967).

## 1.5. Modèle biologique

Le modèle biologique employé dans le cadre de cette étude est *Bombus terrestris* (L.) à large distribution dans la région Ouest – Paléarctique. Cette espèce appartient au sous-genre *Bombus* Latreille, 1802 sensu stricto (= *Terrestribombus* Vogt, 1911). Ce sous-genre comprend aussi les espèces suivantes en Europe Occidentale: *Bombus cryptarum* Fabricius, *Bombus lucorum* (L.), *Bombus magnus* Vogt et *Bombus sporadicus* Nylander. D'autres espèces se trouvent en Amérique du Nord (*Bombus moderatus* Cresson, *Bombus occidentalis* Greene et *Bombus terricola* Kirby); en Extrême-Orient (*Bombus hypocrita* Pérez, *Bombus ignitus* Smith); en Russie (*Bombus albocinctus* Vogt, *Bombus patagiatus* Nylander, *Bombus florilegus* Panfilov) et dans l'Himalaya (*Bombus tunicatus* Smith et *Bombus reinigi* Tkalcu).

Il existe encore une longue liste de taxons au statut incertain.

*Bombus terrestris* est la seule espèce de bourdon dont la distribution est centrée sur la Méditerranée (fig. 3). Cette distribution a pour limites au nord la latitude de Stockholm, au sud-ouest les Canaries, et à l'est l'Altaï.

*B. terrestris* inclut 9 sous-espèces (Rasmont, 1983):

- ssp. *terrestris* (L., 1758) en Europe continentale au nord du 45<sup>ème</sup> parallèle jusqu'au sud de la Fennoscandinavie;
- ssp. *africanus* Krüger, 1956 en Afrique du Nord;
- ssp. *audax* (Harris, 1780) des îles britanniques;
- ssp. *dalmatinus* Dalla Torre, 1882 du sud-est de la France, aux Balkans, ainsi qu'en Turquie, au sud de la Russie et l'Altaï.

- ssp. *lusitanicus* Krüger, 1956 au sud-ouest de la France, en péninsule ibérique, aux Baléares et à Madère;
- ssp. *calabricus* Krüger, 1958 dans le sud de l'Italie, en Calabre et en Sicile;
- ssp. *sassaricus* Tournier, 1890 endémique de Sardaigne;
- ssp. *xanthopus* Kriechbaumer, 1870 de Corse, de l'île de Capraia et de l'île d'Elbe;
- ssp. *canariensis* Pérez, 1895, des Canaries.

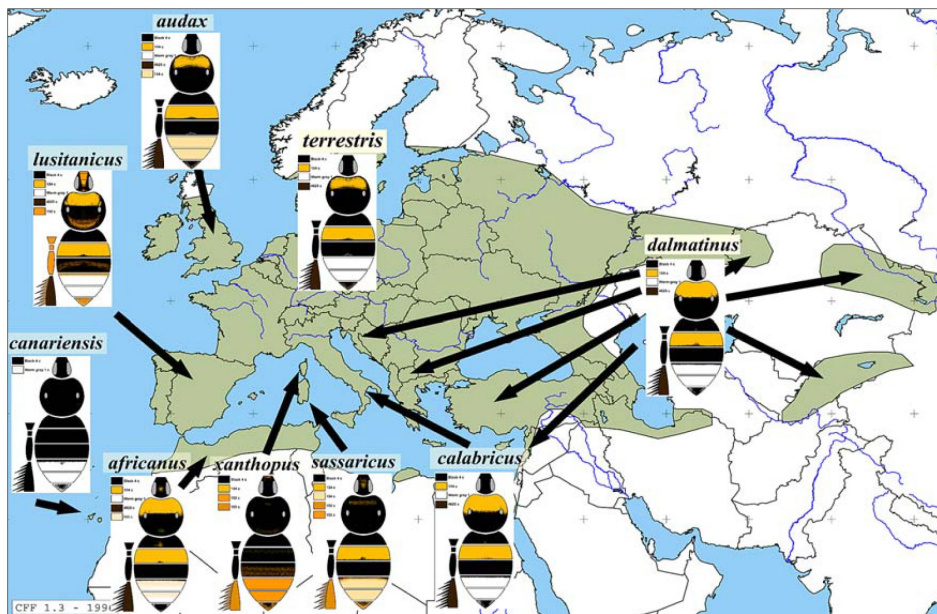


Figure 3. Distribution de *Bombus terrestris* (L.) (d'après Rasmont com. pers.).

## 1.6. Glandes labiales céphaliques

Les comportements pré-copulatoires des bourdons ont été étudiés depuis l'époque de Darwin. Sladen (1912) a été un précurseur dans l'étude des phéromones nuptiales. Il a suggéré que les mâles de bourdons utilisent les composés odorants comme signaux attractifs pour rencontrer une reine vierge (Bergman, 1997).

Certains auteurs (Haas, 1952; Stein, 1962) ont pensé que les glandes mandibulaires produisent les phéromones nuptiales mâles. Des études chimiques et éthologiques ont montré que ces glandes n'élaborent que les odeurs défensives. Il semble que ce soit le cas chez les mâles, les reines et les ouvrières de bourdons. De plus, les glandes mandibulaires sont à l'origine des phéromones nuptiales des reines (Ågren *et al.*, 1979).

La spécificité des sécrétions des glandes labiales céphaliques (GLC) a été mise en évidence par Calam (1969).

Depuis, de nombreuses recherches ont permis de dresser la liste des composés principaux des GLC de nombreuses espèces de bourdons (Svensson, & Bergström, 1977; Bergström, 1981; Cederberg *et al.*, 1984; Bergström *et al.*, 1985; Bertsch, 1997; Pamilo *et al.*, 1997; Terzo *et al.*, 2003; Urbanová *et al.*, 2004; Rasmont *et al.*, 2005). Le tableau 1 reprend des exemples de composés principaux des GLC de différents sous-genres et espèces.

**Tableau 1. Exemples de sécrétions des glandes labiales céphaliques chez des mâles de bourdons (d'après Bergström, 1981)**

Sous-genres	Composés principaux subgénérique (a) et spécifique (b)
<i>Bombus s.s.</i>	a. Chaînes aliphatiques d'éthyl esters b. Dihydrofarnesol
<i>Pyrobombus</i>	a. Mono-, sesqui-, diterpènes acycliques b. Hexadécényl acétate
<i>Alpinobombus</i>	a. Chaînes aliphatiques d'alcools b. Chaînes aliphatiques d'acétates et de butyrates
<i>Megabombus</i>	a. Chaînes aliphatiques d'alcools et sesqui- et diterpènes acycliques b. Nonadécène et octadécényl acétate
<i>Psithyrus</i>	a. Chaînes aliphatiques d'alcools et mono-, sesqui- et diterpènes acycliques b. Octadécyl acétate et éthyl tetradécénoate

Les expériences éthologiques de Kullenberg *et al.* ont révélé que les glandes labiales céphaliques comprennent des phéromones nuptiales mâles (Kullenberg *et al.*, 1973).

Une grande variabilité dans le bouquet phéromonal a été mise en évidence aux niveaux intra-spécifique et même intra-populationnel (Terzo *et al.*, 2005), ainsi qu'en fonction de l'âge (Ågren *et al.*, 1979; Coppée *et al.*, 2006; Šobotník *et al.*, in prep.).

Les composés des GLC qui induisent les réponses sexuelles correspondent à la partie phéromonale des sécrétions A l'heure actuelle, ces composés ne sont encore identifiés chez

aucune espèce de bourdon. On ignore également à quel point la variabilité de la composition de la sécrétion des GLC modifie la réponse éthologique. On sait uniquement que cette sécrétion est globalement hautement spécifique (Rasmont & Terzo, in prep.a).

On pourrait s'attendre à ce que les compositions des sécrétions des GLC d'espèces proches soient très différentes. La divergence permettrait dans ce cas de minimiser le risque d'hybridation (Svensson, 1979). Au contraire, on remarque dans la plupart des sous-genres, des affinités certaines dans leurs composés principaux (Bergström *et al.*, 1981; Terzo *et al.*, 2003). Ceci porte à croire que la composition des bouquets phéromonaux serait partiellement déterminée par les affinités phylogénétiques plutôt que par les nécessités d'isolement d'espèces proches (Rasmont & Terzo, in prep.a).

## 1.7. Olfaction

### 1.7.1. Définition

La capacité de chémoréception est universelle chez les organismes vivants. La chémoréception permet à une cellule de répondre aux substances sans internalisation ni métabolisation (Hildebrand, 1995).

L'évolution de la chémoréception a abouti aux distinctions anatomique et fonctionnelle de deux systèmes chémosensoriels: les systèmes olfactifs et gustatifs. Ces systèmes sont distinguables chez les organismes qui ont un système nerveux central. La distinction est basée sur la disposition des cellules chémoréceptrices et sur l'organisation centrale de leurs axones afférents (Hildebrand, 1995).

L'olfaction, comme la gustation, dispose de cellules réceptrices densément aménagées dans les épithélia et exposées à l'environnement (Hildebrand, 1995).

Les organes chémosensoriels des insectes, olfactifs et gustatifs confondus, sont localisés sur les antennes, les palpes labiaux et maxillaires, les pattes, les ailes ainsi que sur d'autres parties du corps. Les sensilles chémosensorielles des antennes servent en grande partie à la fonction olfactive, alors que celles des parties buccales et tarsales sont gustatives (Homberg, 2004).

L'organisation centrale de ces deux types de chémoréception est différente en terme d'organe cible atteint par les axones afférents. Ceux de la gustation se projettent vers le ganglion sub-oesophagial dans le cerveau. Ce ganglion est l'équivalent de l'aire corticale associative de la gustation chez les mammifères.

Les organes cibles des axones afférents de l'olfaction sont présentés au point 1.7.5. intitulé: Intégration de l'information (Perry *et al.*, 2004).

### 1.7.2. Rôle

Chez les insectes, l'olfaction est un sens crucial qui module de nombreux aspects comportementaux.

En effet, elle est généralement l'intermédiaire de comportements tels que la communication et les reconnaissances intra- et inter-spécifiques. Chez de nombreuses espèces d'insectes, l'olfaction est décisive dans le contrôle de plusieurs sortes de comportements comme l'orientation, la fuite d'un prédateur, la recherche de sources de nourriture, les interactions avec des partenaires sexuels potentiels.

Lors de ces divers comportements, les insectes répondent à une série de composés chimiques incluant les phéromones et les kairomones.

Un cas très étudié est celui des phéromones d'activités nuptiales de *Manduca sexta* L. (Lepidoptera, Sphingidae). Le mâle est capable de percevoir à longue distance de petits composés phéromonaux émis par les femelles conspécifiques. Cette perception initie alors un comportement de vol stéréotypé à la poursuite de la femelle (Hildebrand, 1995).

### 1.7.3. Perception

La perception des phéromones d'activités nuptiales chez les insectes s'effectue par leurs antennes.

En effet, les antennes des insectes sont couvertes de près de 60 000 sensilles qui se partagent environ 150 000 neurones sensoriels aussi appelés neurones récepteurs olfactifs (« *olfactory receptor neurons* », ORN<sub>s</sub>).

Parmi ces derniers, il y a des récepteurs spécialisés pour la détection de substances chimiques très spécifiques et d'autres capables de répondre à une large variété de composés. Chez le mâle de *Telea polyphemus* (Lepidoptera, Saturniidae), environ 60 à 70% des neurones sensoriels sont spécialisés pour la détection des phéromones d'activités nuptiales femelles. Ces récepteurs olfactifs dits spécialistes, ne sont pas toujours absolument spécifiques à une molécule. Par exemple, des récepteurs olfactifs spécialistes de l'acide 9-oxo-trans-2-décanoïque (phéromone d'activité nuptiale) de l'antenne du mâle de l'abeille domestique peuvent aussi répondre à l'acide caproïque à condition qu'il soit présenté en concentration 10000 fois plus importante que celle de la phéromone d'activité nuptiale (Nation, 2001).

### 1.7.4. Transduction du signal olfactif

La façon dont le signal olfactif est converti chez *Bombus* est inconnue.

Chez les autres animaux, les neurones olfactifs utilisent des nucléotides cycliques ou

l'inositol triphosphate ( $IP_3$ ) comme second messenger (Ache, 1994; Hildebrand & Shepherd, 1997).

Dans les neurones récepteurs olfactifs des vertébrés et du Nématode *Caenorhabditis elegans*, les récepteurs olfactifs sont couplés à des protéines G. Ces dernières augmentent les taux d'AMPc et de GMPc qui mènent à l'ouverture des canaux sensibles à la chaîne des nucléotides cycliques (fig. 4). Ces derniers sont des canaux cationiques qui permettent l'entrée de  $Ca^{2+}$ . Le calcium active l'ouverture des canaux au chlore qui provoque la sortie du Cl. La dépolarisation membranaire a alors lieu (Belluscio *et al.*, 1998). Lors d'une dépolarisation la surface membranaire est donc négative.

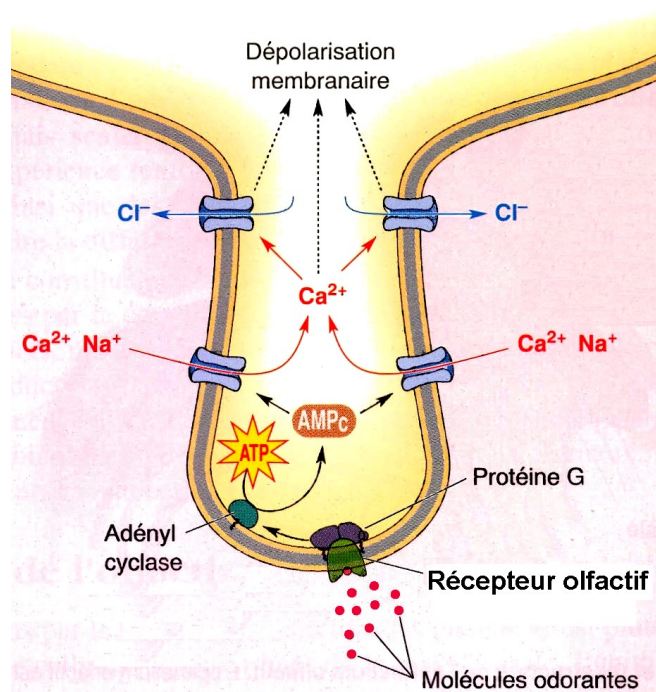


Figure 4. Mécanisme de transduction des odeurs dans le système olfactif des vertébrés (d'après Bear *et al.*, 1997).

### 1.7.5. Intégration de l'information

La voie de l'olfaction antennaire semble avoir une caractéristique universelle. Tous les neurones sensoriels d'une antenne aboutissent dans le lobe antennaire de cette antenne (fig. 5). Les deux lobes antennaires se situent dans le deutocérébron. Le lobe antennaire est le premier centre relais pour les fibres olfactives afférentes qui pénètrent dans le cerveau. Certaines d'entre-elles continuent via le tractus antenno-cérébral dorso-médian jusqu'au protocérébron. Les cibles majeures des fibres sortant du lobe antennaire sont le calice

primaire des corps pédonculés (« mushroom bodies ») et l'aire du protocérébron latéral (« lateral horn ») (Homberg, 2004).

Chez l'abeille domestique, les 150 000 récepteurs olfactifs d'une antenne se subdivisent dans les 160 glomérules identifiés d'un lobe antennaire. Le glomérule comprend donc environ 940 neurones. Il est l'unité fonctionnelle du lobe antennaire. Les glomérules sont interconnectés par environ 4000 interneurones locaux.

Le lobe antennaire présente environ 800 projections neuronales vers les centres cibles du protocérébron (Galizia & Menzel, 2000).

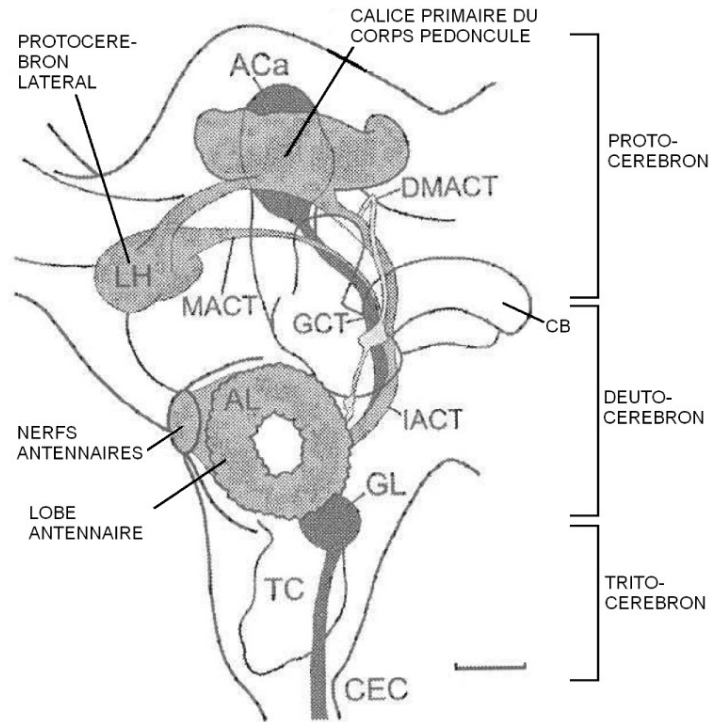
Pour comprendre l'intégration de l'olfaction au niveau du lobe antennaire, il faut plusieurs méthodologies.

Une première est le code olfactif. Il consiste en une série de règles de transformation qui mènent à une représentation neuronale du stimulus olfactif. Cette représentation est cependant influencée par la signification comportementale du stimulus. Les propriétés physiques et éthologiques sont intégrées dans le code olfactif.

Par les propriétés physiques d'un stimulus olfactif on entend savoir si l'odeur présentée à l'individu provoque chez lui une réaction neuronale. Des mesures physiologiques permettent de quantifier la réaction engendrée (Galizia & Menzel, 2000).

Les propriétés éthologiques concernent les effets comportementaux ultérieurs à l'exposition à une odeur. Une étude éthologique concerne le réflexe d'extension du proboscis sur *Apis mellifera*. Elle met en évidence l'aspect éthologique des réactions olfactives. En effet, la présentation d'une odeur appétante à un individu non repu provoque l'extension de son proboscis (Galizia & Menzel, 2000).

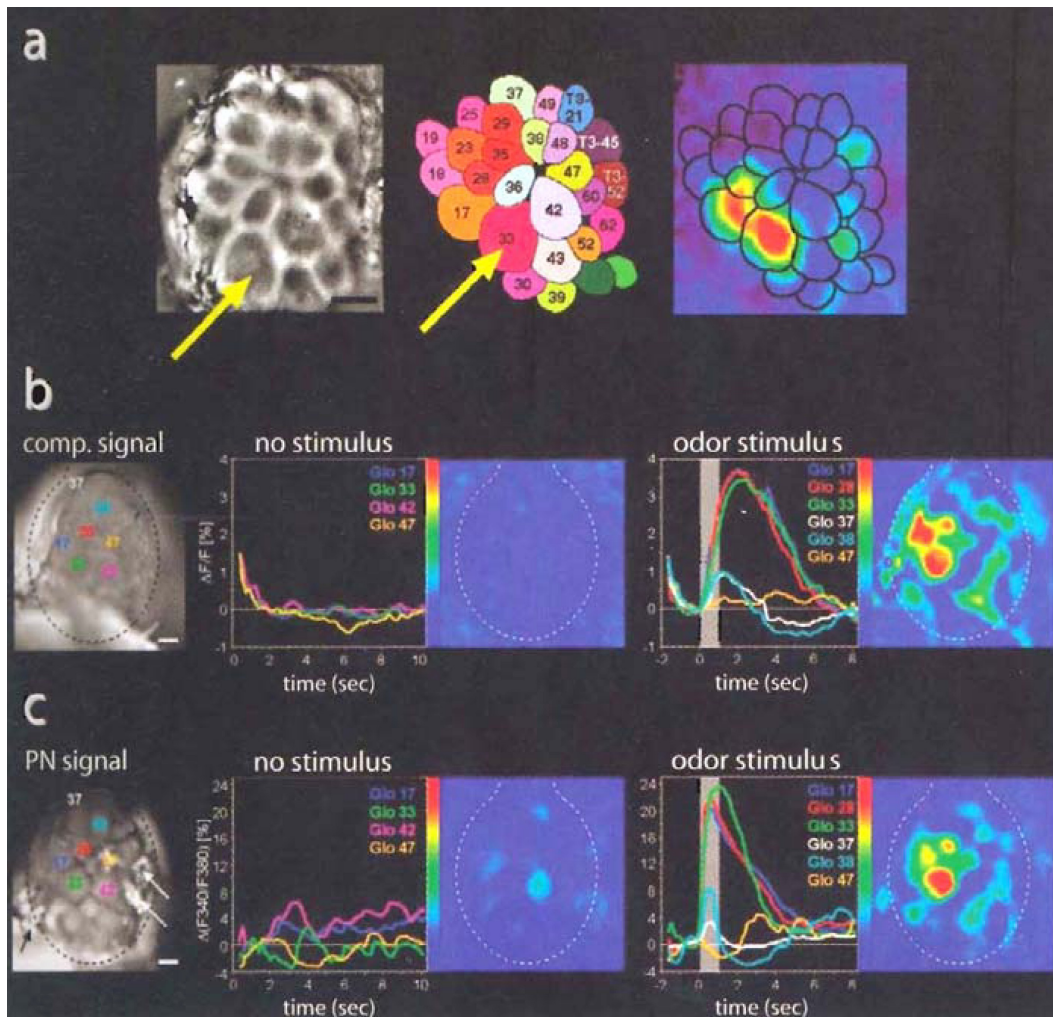
Galizia et Menzel ont représenté l'intégration de l'olfaction au sein des lobes antennaires, avec une seconde méthodologie, l'imagerie calcique. Cette technique d'imagerie optique repose sur la coloration fluorescente des glomérules du lobe antennaire. La fluorescence augmente avec l'activité des neurones. Lors d'une exposition à une odeur, les glomérules dont les neurones sont actifs, voient leur fluorescence augmenter. La localisation de l'activité est alors évidente. On appelle les images obtenues « modèles d'activité » (Galizia & Menzel, 2000; fig. 6).



**Figure 5. Voies chemosensorielles en vue latérale.** ACa: calice accessoire du corps pédonculé; AL: lobe antennaire; CB: corps central; CEC: connexion circum-oesophagiale; DMACT: tractus antenno-cérébral dorso-médian; GCT: tractus calico-glomérulaire; GL: lobe glomérulaire; IACT: tractus antenno-cérébral interne; LH: l'aire du protocérébron latéral; MACT: tractus antenno-cérébral moyen; TC: tritocérebion. (d'après Homberg, 2004).

Chaque stimulus olfactif provoque sa propre mosaïque de glomérules activés, en d'autres termes, sa propre mosaïque de fluorescence. Chaque glomérule peut participer à plusieurs mosaïques. Les réponses des glomérules face à un stimulus sont graduelles. Un glomérule peut réagir plus fortement à une odeur plutôt qu'à une autre (Galizia & Menzel, 2000).





**Figure 6. Modèles d'activité des glomérules du lobe antennaire chez *Apis mellifera*** (d'après Galizia & Vetter, 2004).

## 1.8. Chémotaxonomie

La chémotaxonomie consiste à utiliser des composés chimiques comme outils taxonomiques et phylogéniques.

Pour différentes espèces de bourdons, il existe une liste de tous les composés rencontrés dans les glandes labiales céphaliques (Bergström, 1980; Terzo *et al.*, 2003). Les espèces se différencient par la présence ou l'absence de certains composés. Les composés chimiques sont employés comme des caractères taxonomiques.

L'analyse chimique et la comparaison des compositions de différentes espèces peuvent être des outils utiles pour réaliser la phylogénèse de ces espèces. L'analyse chimique est effectuée sur les solutions de glandes labiales céphaliques de différents modèles biologiques.

Mais ce n'est pas uniquement les phéromones de marquage qui sont importantes. Les aspects temporel et spatial au moment du marquage peuvent aussi entrer en compte (Svensson, 1979).

## 1.9. Objectifs

La présente étude vise à identifier les molécules du bouquet phéromonal des GLC des mâles qui déclenchent un stimulus olfactif chez la femelle vierge de *B. terrestris*.

Deux sous-espèces de reines sont testées: *Bombus terrestris dalmatinus* Dalla Torre et *Bombus terrestris canariensis* Pérez.

Les expériences se basent sur l'électro-antennographie (EAG) ainsi que de l'électro-antennographie couplée à de la chromatographie en phase gazeuse (GC-EAD).

Les antennes des reines vierges de ces sous-espèces sont vaporisées par les bouquets phéromonaux des mâles des mêmes deux sous-espèces.

Comme il s'agit d'un sujet de recherche très nouveau, le premier objectif est de mettre en place un protocole d'expérimentation.

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.1. Matériel biologique

Des reines vierges vivantes ont été utilisées pour pratiquer les différents tests. Les sécrétions des glandes labiales céphaliques de mâles âgés de 7 à 10 jours ont aussi été nécessaires.

Les bourdons proviennent tous de colonies d'élevage fournies par la société Biobest. Les reines vierges sont de deux sous-espèces de *Bombus terrestris*: ssp. *dalmatinus* Dalla Torre, 1882 et ssp. *canariensis* Pérez, 1895. Les solutions de glandes labiales céphaliques proviennent de mâles de *B. t. dalmatinus* Dalla Torre, 1882 et de *B. t. canariensis* Pérez, 1895.

Les reines sont maintenues en vie dans une salle d'élevage. Il s'agit d'une pièce occultée, où il règne une température comprise entre 25 et 27°C et une humidité maintenue entre 45 et 55 % RH. Cette atmosphère est réglée à l'aide d'un humidificateur, un chauffage électrique et une aération faible. Les individus sont regroupés par trois dans des cages de maintenance. Il s'agit de boîtes en bois de pin non traité de 30 cm de long, 15 cm de large et de 11 cm de hauteur (fig. 7).

Elles y sont nourries ad libitum avec du pollen à dominance de *Cistus* sp., congelé à l'état frais fourni par la société Percie du Sert. Ils reçoivent aussi du sirop (eau sucrée 50/50 v/v).



Figure 7. Cage de maintenance (Photo originale).

## 2.2. Préparation des glandes céphaliques labiales

### 2.2.1. Technique de dissection

Les individus mâles âgés de 7 à 10 jours, sont tués par congélation puis disséqués. A l'aide d'un scalpel, on effectue une incision verticale de haut en bas le long de l'oeil. On retire la cuticule oculaire de chaque oeil. Derrière celle-ci se trouvent les glandes labiales céphaliques (fig. 8). Elles sont prélevées à l'aide d'une pince fine. Les deux glandes d'un individu sont alors placées dans un flacon. On ajoute dans chacun des flacons 200  $\mu$ l d'hexane comme solvant. Les glandes de chaque individu sont conservées dans des flacons séparés.



**Figure 8. Dissection des glandes labiales céphaliques (Photo M. Terzo).**

### **2.2.2. Conservation des glandes**

Les flacons qui contiennent les glandes sont conservés à température ambiante durant 24 heures. Au cours de ces 24 heures, les molécules contenues dans les glandes diffusent dans le solvant. Au terme de ces 24 heures, les flacons sont placés dans un congélateur maintenu à la température constante de - 30°C. La conservation à une telle basse température limite la dégradation des solutions.

### **2.2.3. Préparation des solutions**

Les solutions de glandes labiales céphaliques (GLC) sont diluées dans le solvant. L'obtention de solutions des GLC plus concentrées en composés phéromonaux, nécessite une préparation.

Une fraction (50 µl) des solutions contenues dans les flacons est prélevée. Les prélèvements de chacune des solutions sont placés dans une autre série de flacons. Les glandes labiales céphaliques restent dans le flacon de base afin de pouvoir les réutiliser au besoin. Les solutions de la nouvelle série de flacons sont évaporées à l'aide d'un jet d'azote. Ce jet permet de faire évaporer les molécules les plus légères de la solution. Ces dernières sont vraisemblablement celles du solvant, l'hexane, qui est très volatile (6 carbones). Il ne reste alors pour 50 µl de solution que quelques µl concentrés en composés des GLC.

## **2.3. Electro-antennographie**

### **2.3.1. Electro-antennographie sur reine entière**

#### **2.3.1.1. Isolation de la reine**

L'activité neuronale des reines est mesurée avec un électro-antennographe (EAG). Cependant, seule l'activité générée au niveau des antennes et du lobe antennaire a un intérêt. Il faut donc tenter de limiter les réponses neuronales enregistrées à celles émises par le lobe antennaire.

Il s'agit alors d'immobiliser et d'isoler le corps de la reine au maximum. En effet, l'immobilisation limite les influx nerveux provoqués par les mouvements du corps de l'individu. Il est par contre évident que les mouvements respiratoires doivent être respectés. Les orifices respiratoires et les sacs aérifères sont dans le métasome. De ce fait, ce dernier ne peut être ni immobilisé, ni isolé.

L'isolation minimise les interactions sensorielles de tout type avec le milieu d'expérimentation. L'immobilisation et l'isolation se font grâce à une méthode où l'on place l'insecte dans de la pâte à modeler (Verheggen *et al.*, *soumis a*). Celle-ci est composée majoritairement de longues chaînes d'acides octodécanoïques, de pétrole et de carbonates de calcium. Seuls les antennes et l'abdomen sont libres.

Les composés de la pâte à modeler sont très certainement perçus par les diverses récepteurs olfactifs de la reine. Ils sont en concentration si élevée et constamment en contact avec les récepteurs spécifiques.

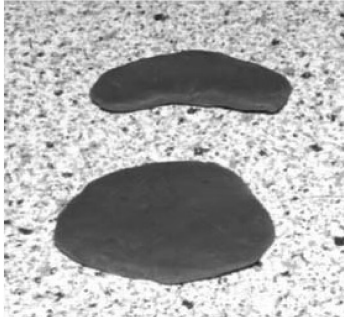
Or, l'aptitude des neurones récepteurs olfactifs (ORN<sub>s</sub>) à répondre aux stimuli est fonction du taux relatif d'adaptation et de désadaptation. Ces taux sont eux dépendants du temps et de la concentration du stimulus olfactif (Almaas *et al.*, 1991; Borroni & O'Connell, 1992; Heinbockel & Kaissling, 1996).

L'emploi de la pâte à modeler pour les expérimentations ne pose donc pas de problème.

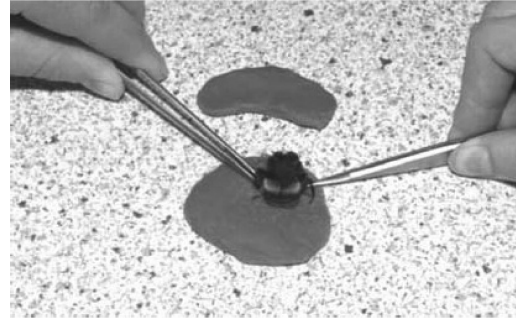
Voici les étapes successives de l'isolation:

- on prépare deux pièces de pâte à modeler dont la superficie dépend de la taille de l'individu (+/- 3 cm de diamètre; fig. 9);
- à l'aide de pinces, on place la reine ventralement sur la plus grande des pièces de pâte à modeler (fig. 10)
- on place la seconde pièce de pâte à modeler sur le thorax de la reine (fig. 11);
- tout en maintenant l'individu par les pattes, on presse les extrémités des pièces de pâte à modeler (fig. 12);
- on lâche les pattes et on colmate les espaces entre l'individu et les pièces de pâte à modeler (fig. 13);
- on place un petit cylindre de pâte à modeler entre les antennes de la reine, afin d'immobiliser les scapes, et ainsi de maintenir les antennes dans une position optimale (fig. 14);
- on colmate le tout pour ne laisser passer que les antennes et l'abdomen (fig. 15).

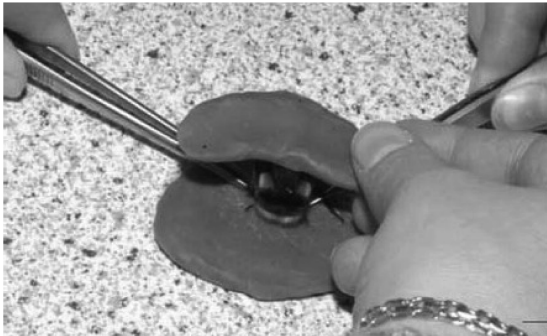




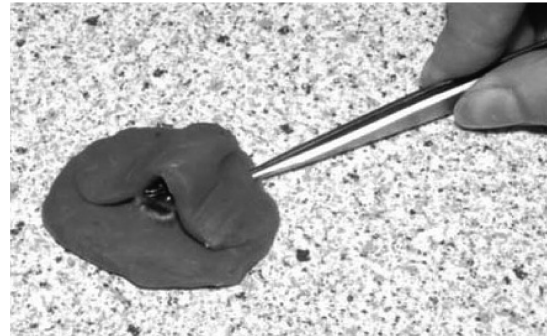
**Figure 9.** Pièces de pâte à modeler pour l'isolation de la reine (photo originale).



**Figure 10.** La reine est immobilisée face à la première pièce de pâte à modeler (photo originale).



**Figure 11.** La reine est recouverte par la seconde pièce de pâte à modeler (photo originale).



**Figure 12.** On presse la reine entre les deux pièces de pâte à modeler (photo originale).



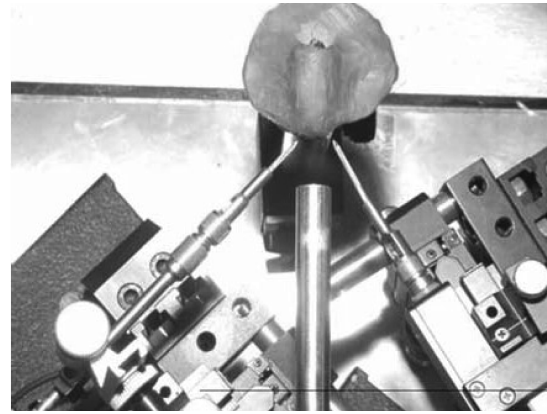
**Figure 13.** On colmate les espaces libres (photo originale).



**Figure 14.** Un cylindre de pâte à modeler est placé entre les deux antennes (photo originale).



**Figure 15.** Etat final de la reine avant expérimentation (photo originale).



**Figure 16.** Appareillage d'électrodes (photo originale).

### 2.3.1.2. Electro-antennographe

#### 2.3.1.2.1. Principe et matériel

L'électro-antennographe est un appareil d'enregistrement de l'activité électrique des antennes. L'activité neuronale des reines immobilisées et isolées est donc amplifiée et transcrite par cet appareil. Comme décrit ci-dessous, l'enregistrement est externe. Le potentiel de repos apparaîtrait donc positif. Une dépolarisation se visualise par un pic vers le bas par rapport à la ligne de base.

L'électro-antennographe consiste en:

- un binoculaire;

- un appareillage d'électrodes (figs. 16 et 17). Il s'agit de deux électrodes d'argent, l'une réceptrice et l'autre de référence. Elles sont toutes deux insérées sur un support magnétique par des mobiles. Les mobiles sont millimétriques et déplaçables en temps voulu. Lors du positionnement des électrodes vis-à-vis des antennes, on désactive le magnétisme. On réactive le magnétisme lors de l'expérimentation. Le support magnétique limite les mouvements et donc les troubles durant l'enregistrement (Verheggen *et al.*, 2007).

Le contact entre les antennes de la reine et les électrodes n'est pas direct. Il a lieu par l'intermédiaire d'une solution saline contenue dans des micro-capillaires (figs. 17 et 18). La composition de la solution saline pour 1 litre d'eau distillée est la suivante:

- NaCl	–	7,5 gr
- CaCl <sub>2</sub>	–	0,21 gr
- KCl	–	0,35 gr
- NaHCO <sub>3</sub>	–	0,2 gr (Verheggen <i>et al.</i> , soumis b).

L'électrode de référence consiste à couvrir l'une des deux antennes entièrement à l'intérieur du micro-capillaire. L'électrode réceptrice est mise en contact avec l'autre antenne via la solution saline.

- une boîte de flux: la boîte de flux engendre un flux d'air continu. Celui-ci passe dans un humidificateur. Les particules présentes dans le flux d'air sont accrochées par les gouttelettes d'eau. L'air qui sort de l'humidificateur, est non seulement humidifié, mais aussi purifié.



- un amplificateur Syntech-Autospike modèle IDAC4. Cet appareillage d'électrodes et la boîte de flux sont reliés à l'amplificateur. Ce dernier amplifie l'activité électrique émise au niveau de l'antenne réceptrice.

- le logiciel AutoSpike32 (version 3.0). Ce logiciel est installé sur l'ordinateur connecté à l'amplificateur. Il intègre les données provenant des électrodes et de la boîte de flux par l'intermédiaire de l'amplificateur.

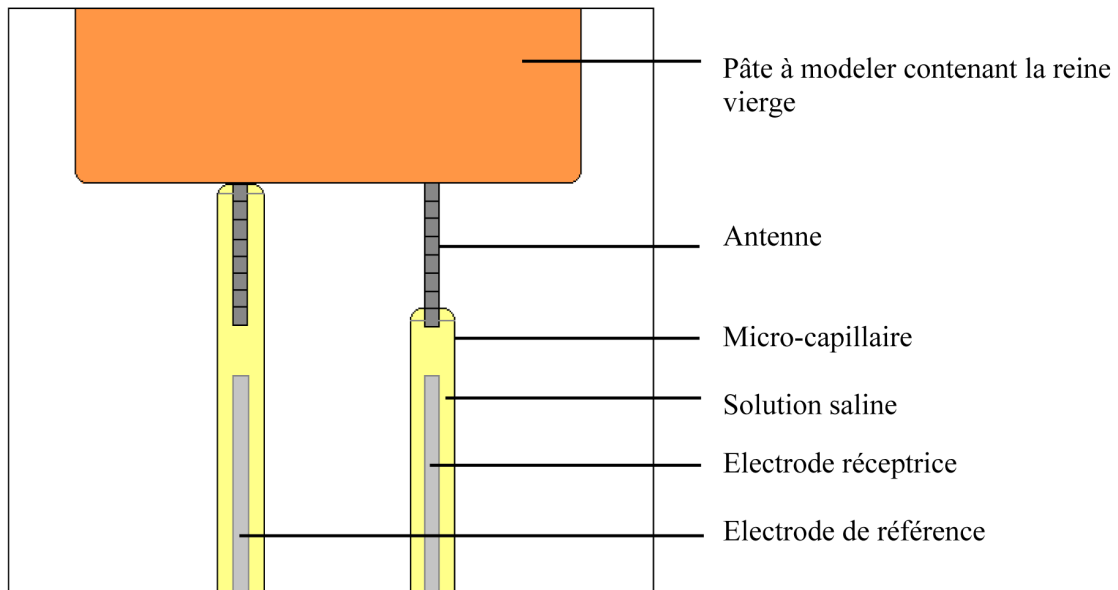


Figure 17. Schéma détaillé du contact entre les antennes et les 2 électrodes (Schéma original).

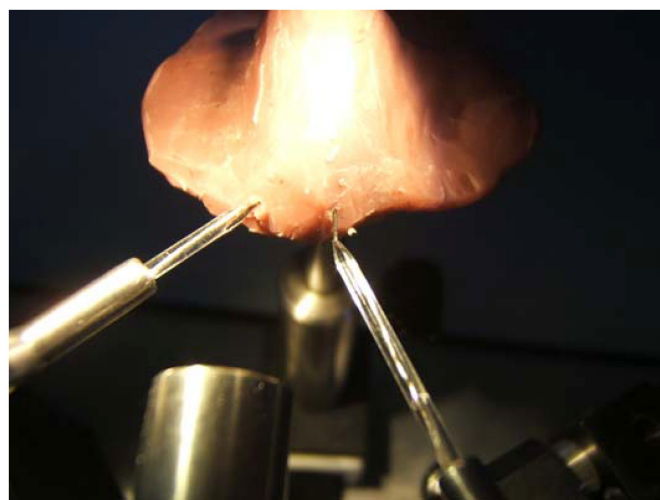


Figure 18. Montage de la méthode de travail sur reine entière, contact entre les antennes et les électrodes (Photo originale).

### 2.3.1.2.2. Expérimentation

L'enregistrement des réponses neuronales des reines vierges aux différentes solutions de glandes labiales céphaliques s'effectue par l'électro-antennographe.

L'activité neuronale d'une reine de l'une des deux sous-espèces testées de *Bombus terrestris* est enregistrée.

A 30 secondes d'intervalle, 1 µl de la solution des GLC de l'autre sous-espèce, 1 µl de solvant (hexane) et 1 µl de la solution des GLC de sa propre sous-espèce, sont chacun placé sur un papier filtre différent. Le temps d'évaporation pour chacune des trois solutions est de 2 minutes. Pendant ce temps, les papiers filtres sont maintenus dans des petites boîtes de Pétri ouvertes.

Un spray mécanique à blanc est tout d'abord effectué. Celui-ci sert de témoin. Il met en évidence une éventuelle réaction neuronale de la reine au spray d'air humidifié et purifié.

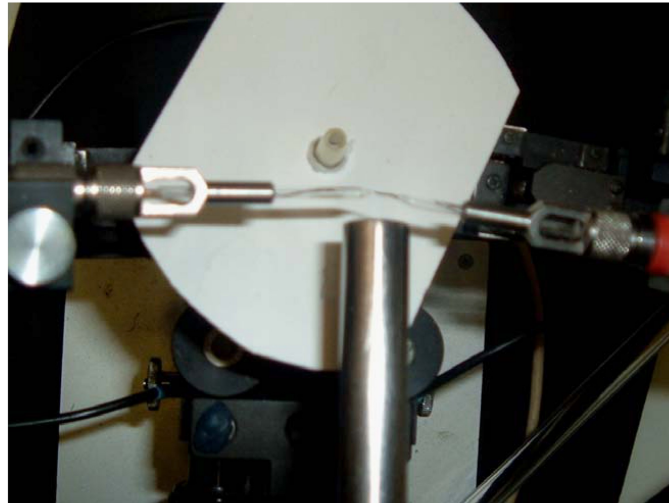
Après un délai de 30 secondes, le spray avec le papier filtre de la première solution des GLC est effectué. Toujours avec un intervalle de temps de 30 secondes les sprays du solvant et de l'autre solution sont réalisés. L'activité neuronale de la reine est enregistrée jusqu'à ce qu'elle soit redevenue constante.

## 2.3.2. Electro-antennographie sur antenne

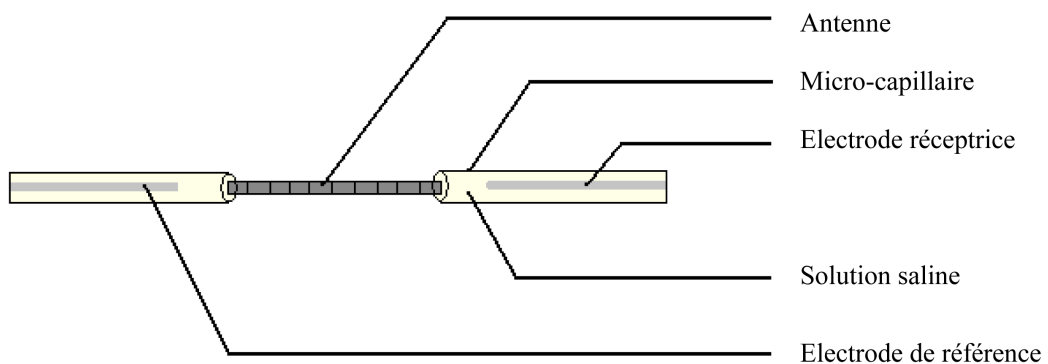
### 2.3.2.1. Mise en place de l'antenne

La méthode sur antenne consiste à travailler sur une antenne détachée du corps de l'insecte (Verheggen, 2007).

L'antenne est entièrement détachée de la tête. Pour plus de facilité de manipulation, le scape et pédicelle sont ensuite enlevés. Le flagellum articulé est placé sur le même dispositif que celui utilisé dans la méthode de travail sur les reines entières. Il porte alors à lui seul les électrodes réceptrice et de référence (figs. 19 et 20).



**Figure 19.** Montage de la méthode de travail sur antenne, contact entre l'antenne et les électrodes (Photo originale).



**Figure 20.** Schéma détaillé du contact entre l'antenne et les électrodes (Schéma original).

### 2.3.2.2. Electro-antennographe

#### 2.3.2.2.1. Principe et matériel

Le principe ainsi que le matériel utilisé dans cette méthode sont identiques à ceux de la méthode sur les reines entières.

#### 2.3.2.2.2. Expérimentation

Une seule antenne par femelle est employée pour les expériences.

Le travail effectué sur les antennes isolées du corps est similaire à celui sur les reines entières. La quantité de solution placée sur le papier filtre est de 1 µl. La différence réside dans le nombre et la nature des sprays. Voici les différents sprays réalisés dans l'ordre chronologique et toujours avec un intervalle de temps de 30 secondes entre chacun d'entre eux:

- spray mécanique (témoin)
- spray de la solution des GLC de l'autre sous-espèce que la reine
- spray mécanique (témoin)
- spray de la solution des GLC de la même sous-espèce que la reine
- spray mécanique (témoin)

### 2.3.3. Le chromatographe en phase gazeuse couplé à l'électro-antennographe

#### 2.3.3.1. Principe et matériel

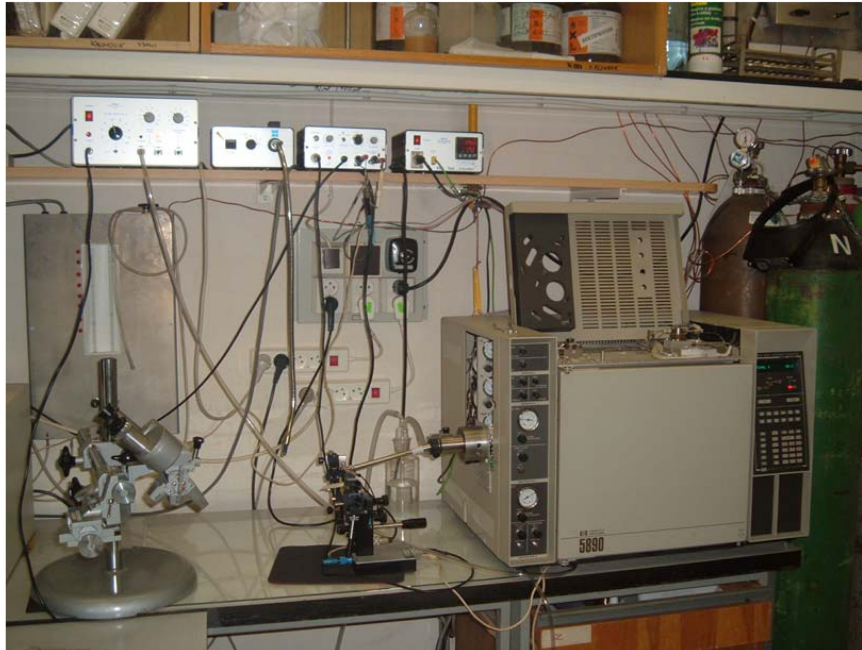
Le chromatographe en phase gazeuse (GC) sépare les composés chimiques d'une solution. La répartition des composés s'effectue selon leurs propriétés physico-chimiques, telles que le poids moléculaire et leur polarité. La colonne employée est apolaire, il n'y a donc pas d'affinité entre elle et les composés. Il est utilisé pour la séparation des molécules des glandes labiales céphaliques.

Le chromatographe employé est un Hewlett Packard 5890. La colonne a une longueur de 30 mètres et un diamètre interne de 0,33 millimètre.

L'électro-antennographe peut être couplé au chromatographe en phase gazeuse (GC-EAD) (fig. 21).

Le matériel de détection électro-antennographique employé lors de ce couplage est quelque peu différent de celui utilisé en EAG seule. Le matériel est différent en ces deux points:

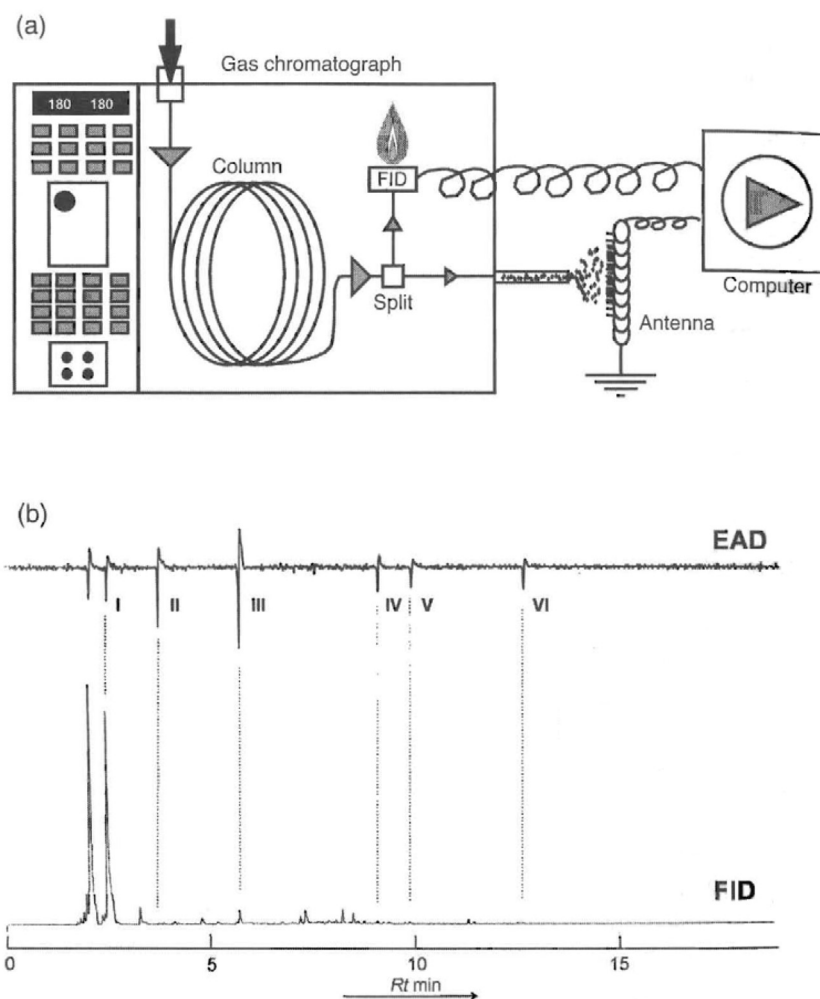
- un amplificateur Syntech-Autospike modèle IDAC 2/3;
- le logiciel EAD (version 2.3).



**Figure 21. Chromatographe en phase gazeuse couplé à l'électro-antennographe (Photo originale).**

Le GC-EAD (gas chromatography-electroantennographic detection) consiste à associer les deux appareils. La reine est positionnée avec l'appareillage d'électrodes comme dans le cadre de l'électro-antennographie. Les molécules sont séparées par le chromatographe en phase gazeuse, puis projetées sur l'antenne réceptrice de l'insecte. Cette projection s'effectue par la boîte de flux. Un flux d'air emporte les composés qui sortent de la colonne du GC.

Chacune des molécules de la solution est alors caractérisée par deux critères: sa concentration relative dans la solution (GC) et la réponse neuronale qu'elle engendre chez l'insecte exposé au composé (EAG), (fig. 22).



**Figure 22. Couplage du chromatographe en phase gazeuse et l'électro-antennographe.** (a): schéma du matériel; (b): exemple de résultats obtenus, EAD: détection électro-antennographique, FID: détection d'ionisation par flamme (d'après Nojima *et al.*, 2003).

### 2.3.3.2. Expérimentation

La chromatographie en phase gazeuse des solutions des GLC est couplée à l'électro-antennographie des reines vierges. La méthode employée est celle du travail sur antenne isolée. Les composés des GLC séparés un à un, sont projetés par le flux d'air sur l'antenne. Ce flux d'air est non seulement humidifié, purifié, mais aussi refroidi par la présence de glace pilée dans le réservoir d'eau. Le refroidissement de l'air est nécessaire pour préserver l'intégrité de l'antenne. En effet, lors des dernières étapes de la séparation des composés par le GC, la température au sortir de la colonne atteint 240°C.

La configuration du GC est identique pour les solutions des GLC de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis*. La température initiale de 40° est atteinte en 0.5 seconde. Cette température augmente dans un premier temps de 40°/min jusque 160°, dans un second temps de 5°/min jusque 220° et dans un troisième temps de 12°/min pour atteindre 240°. Cette dernière température est maintenue durant 3 minutes. La quantité de solution des GLC injectée est de 1 µl.

## 2.4. Analyse des données

### 2.4.1 Mesures

Les mesures des différences de potentiel (ddp) engendrées par les sprays sont effectuées par un outil propre au logiciel AutoSpike32 (version 3.0) (fig. 23). Cet outil mesure en 2 points la valeur de la ligne de base. La première mesure est relevée au point extrême de la ddp. La seconde est effectuée 2 secondes avant la première mesure et est calculée selon une moyenne des valeurs de la ligne de base pendant 3 secondes. Le but de cette seconde mesure est d'avoir un référentiel pour la première. Elle est indispensable pour avoir une valeur de la ddp relative à la ligne de base.

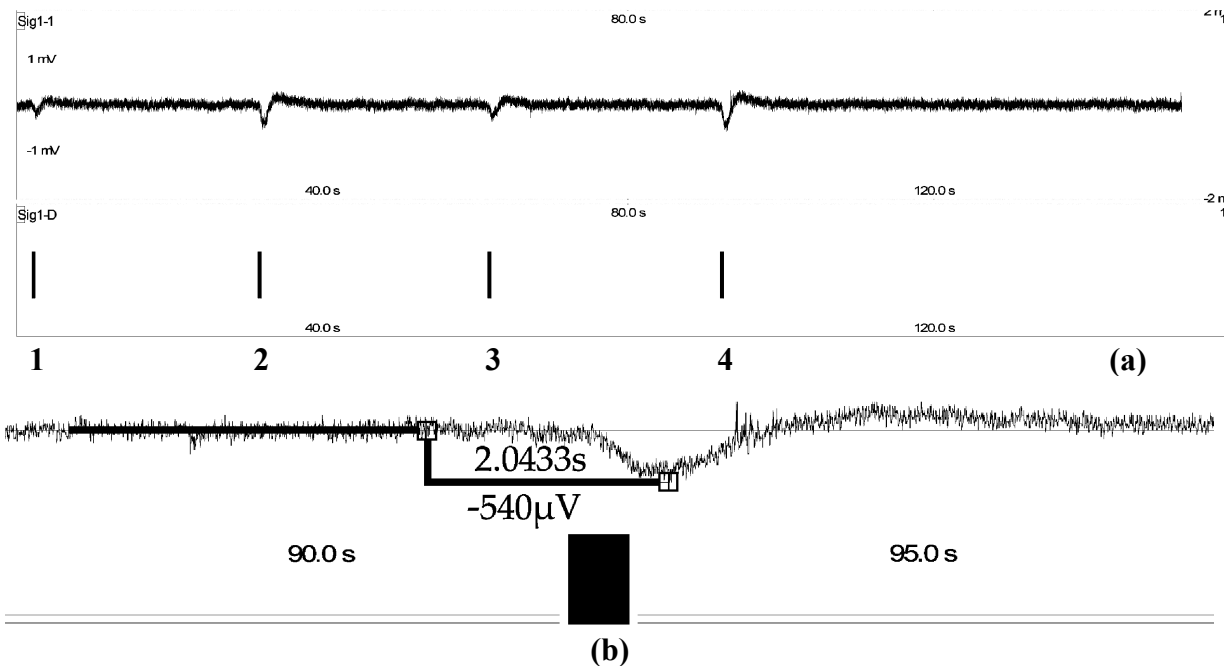


Figure 23. Electro-antennogramme d'une reine de *Bombus terrestris canariensis* avant les mesures (a), mesure de la différence de potentiel engendrée par le quatrième spray (b).

### 2.4.2. Analyse statistique

L'acquisition de données sur du matériel biologique vivant est complexe. Ceci implique une quantité de données peu importante. Il est donc impossible d'obtenir une distribution normale des données. De plus que le travail sur du matériel *in vivo* le permet encore moins. Les données sont donc non paramétriques. Les mesures des ddp engendrées par les différents sprays sont des données indépendantes. Par conséquent, les données non-paramétriques et indépendantes sont analysées par un test de Chi<sup>2</sup> (Siegel & Castellan, 1988).

La gestion des données ainsi que l'analyse de celles-ci sont effectuées dans le tableur Excel.

## 3. Résultats

### 3.1. EAG

#### 3.1.1. EAG sur reine entière

##### 3.1.1.1. Mesure des différences de potentiel

Les différences de potentiel provoquées par les vaporisations sont des mesures négatives.

##### a) Reines de *Bombus terrestris dalmatinus*

Le tableau 2 résume les observations obtenues par la méthode de travail d'électro-antennographie sur 12 reines entières de *B. terrestris dalmatinus*.

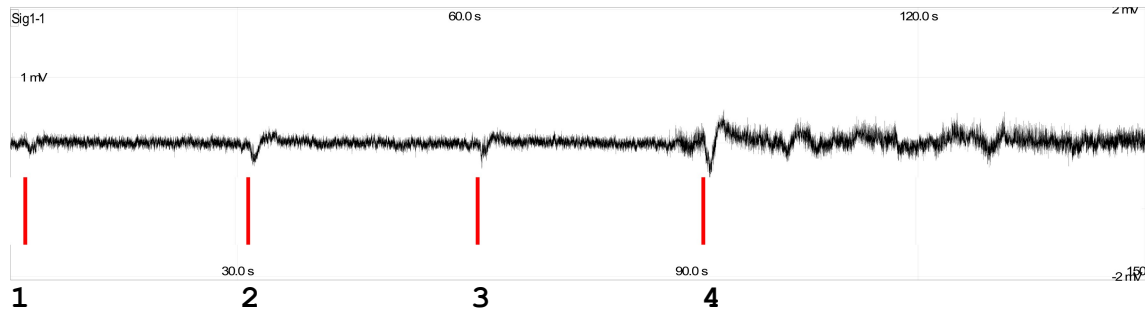
**Tableau 2. Résultats d'électro-antennographie sur 12 reines entières de *B. t. dalmatinus***

Nombre de reines de <i>B. t. dalmatinus</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. dalmatinus</i>	4
Nombre de reines de <i>B. t. dalmatinus</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. canariensis</i>	7
Nombre de reines de <i>B. t. dalmatinus</i> qui présentent un autre résultat	1

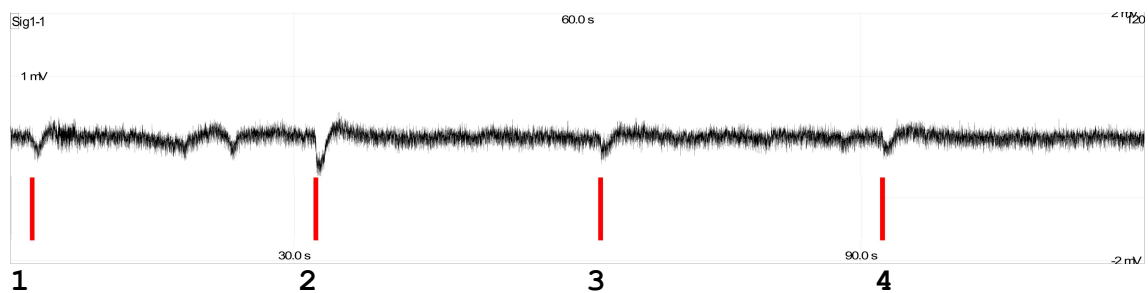


On observe que la majorité des reines réagissent plus fortement aux sécrétions non-consubspécifiques.

Les figures 24 et 25 sont deux exemples d'électro-antennogrammes qui présentent l'enregistrement de l'activité neuronale de la reine de *B. t. dalmatinus* face à une série de vaporisations.



**Figure 24.** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris dalmatinus*, reine n° 33. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. canariensis* 122 (2), d'hexane (3) et des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. dalmatinus* 147 (4).



**Figure 25.** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris dalmatinus*, reine n° 50. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. canariensis* 123 (2), d'hexane (3) et des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. dalmatinus* 150 (4).

Comme on peut l'observer dans les figures ci-dessus, les électro-antennogrammes d'une reine à l'autre peuvent être très différents.

L'entièreté des électro-antennogrammes effectués sur les reines entières de *B. t. dalmatinus* se trouve dans l'annexe 8.1.

Chacun des sprays vaporisés sur les antennes de la reine engendre une différence de potentiel (ddp) négative, alors enregistrée. Les valeurs de ces ddp sont reprises dans le tableau 3 et sont exprimées en micro-volts ( $\mu\text{V}$ ).

Le tableau 3 contient aussi les paramètres statistiques tels que la somme, la médiane, le premier et le dernier quartile des ddp engendrées par chacun des sprays chez toutes les

reines vierges testées de *B. t. dalmatinus*.

**Tableau 3. Mesures des ddp en électro-antennographie sur reine entière de *B. t. dalmatinus* (unité: -  $\mu$ V)**

Reines	Air	<i>B. t. canariensis</i> (M)	Hexane	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)
<i>B. t. dalmatinus</i> R_65B	-	540	420	460
<i>B. t. dalmatinus</i> R_65B	320	460	280	500
<i>B. t. dalmatinus</i> R_38B	120	340	340	320
<i>B. t. dalmatinus</i> R_38B	320	480	320	520
<i>B. t. dalmatinus</i> R_48B	260	300	100	360
<i>B. t. dalmatinus</i> R_48B	200	320	240	240
<i>B. t. dalmatinus</i> R_33B	320	380	240	280
<i>B. t. dalmatinus</i> R_33B	220	320	360	500
<i>B. t. dalmatinus</i> R_50B	380	720	400	340
<i>B. t. dalmatinus</i> R_50B	320	620	180	560
<i>B. t. dalmatinus</i> R_52B	140	320	240	280
<i>B. t. dalmatinus</i> R_52B	240	420	380	260
<b>Somme</b>	<b>2840</b>	<b>5220</b>	<b>3500</b>	<b>4620</b>
<b>Médiane</b>	<b>260</b>	<b>400</b>	<b>300</b>	<b>410</b>
<b>1er Quartile</b>	<b>210</b>	<b>320</b>	<b>240</b>	<b>310</b>
<b>4ème Quartile</b>	<b>380</b>	<b>720</b>	<b>420</b>	<b>560</b>

La variation individuelle des réactions des reines face à un même spray peut être remarquée grâce aux mesures des ddp.

#### b) Reines de *Bombus terrestris canariensis*

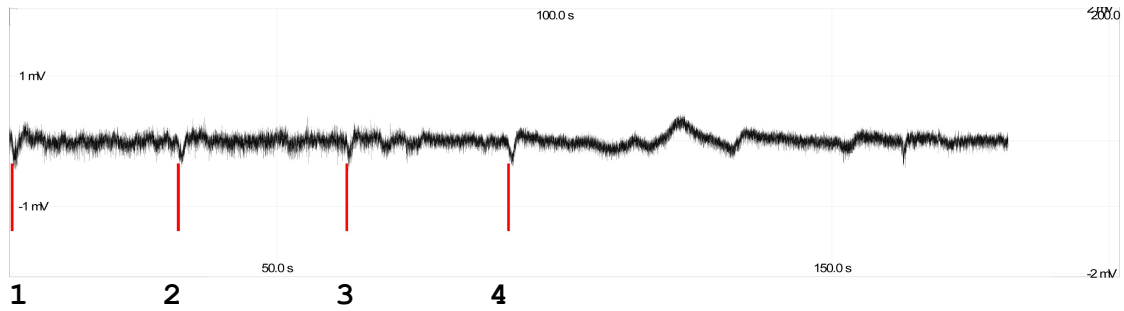
Le tableau 4 résume les observations obtenues en électro-antennographie sur 10 reines entières de *B. t. canariensis*.

Les figures 26 et 27 sont deux exemples d'électro-antennogrammes qui illustrent l'activité neuronale de la reine de *B. t. canariensis* face à une série de vaporisations.

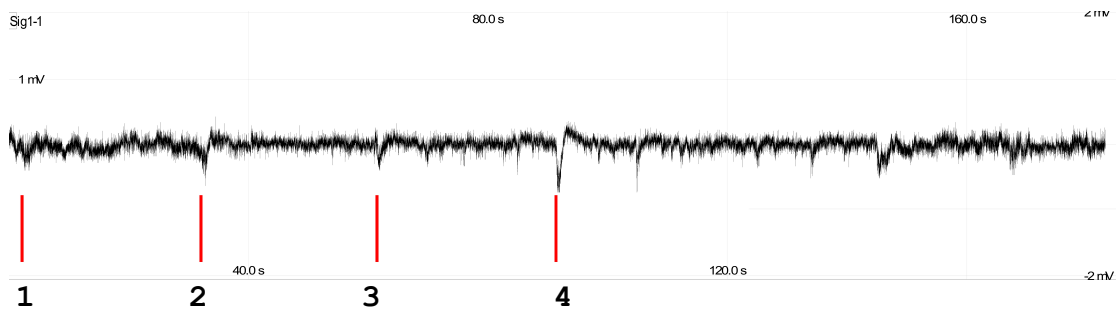
**Tableau 4. Résultats d'électro-antennographie sur 10 reines entières de *B. t. canariensis***

Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. canariensis</i>	7
Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. dalmatinus</i>	2
Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui présentent un autre résultat	1

Contrairement à ce que l'on avait pour *B. t. dalmatinus*, la majorité des reines de *B. t. canariensis* réagit plus fortement aux sécrétions de sa propre ssp.



**Figure 26.** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris canariensis*, reine n° 10. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. dalmatinus* 136 (2), d'hexane (3) et des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. canariensis* 117 (4).



**Figure 27** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris canariensis*, reine n° 11. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. dalmatinus* 143 (2), d'hexane (3) et des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. canariensis* 118 (4).

Comme on l'observe de nouveau chez les reines de *B. t. canariensis*, le profil des électro-antennogrammes est variable d'une reine à l'autre.

L'entièreté des électro-antennogrammes effectués sur les reines entières de *B. t. canariensis* se trouve dans l'annexe 8.2.

Les mesures des ddp enregistrées en électro-antennographie sur reine entière de *B. t. canariensis* ainsi que les paramètres statistiques sont repris dans le tableau 5.

La variation individuelle des réactions face à une vaporisation du même type est visualisée par les valeurs des ddp engendrées.

**Tableau 5. Mesures des ddp en électro-antennographie sur reine entière de *B. t. canariensis* (unité: -  $\mu$ V)**

Reines	Air	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	Hexane	<i>B. t. canariensis</i> (M)
<i>B. t. canariensis</i> R 10B	380	460	380	580
<i>B. t. canariensis</i> R 10B	400	300	360	320
<i>B. t. canariensis</i> R 53B	-	400	380	440
<i>B. t. canariensis</i> R 11B	280	520	360	820
<i>B. t. canariensis</i> R 11B	420	880	620	840
<i>B. t. canariensis</i> R 12B	180	520	300	580
<i>B. t. canariensis</i> R 36B	280	380	360	620
<i>B. t. canariensis</i> R 11B	240	400	260	360
<i>B. t. canariensis</i> R 37B	320	320	360	460
<i>B. t. canariensis</i> R 21B	280	520	340	540
<b>Somme</b>	<b>2780</b>	<b>4700</b>	<b>3720</b>	<b>5560</b>
<b>Médiane</b>	<b>280</b>	<b>430</b>	<b>360</b>	<b>560</b>
<b>1er Quartile</b>	<b>270</b>	<b>380</b>	<b>340</b>	<b>440</b>
<b>4ème Quartile</b>	<b>420</b>	<b>880</b>	<b>620</b>	<b>840</b>

## 3.1.1.2. Comparaison des réactions en réponse aux différents sprays

**a) Représentation graphique**

Le graphique suivant représente en parallèle les médianes des différences de potentiel engendrées chez les reines entières des deux sous-espèces face aux différents sprays vaporisés (fig. 28).

Les réactions des reines des 2 taxons étudiés sont comparées et visualisées sur base de la médiane. La variation individuelle est visualisée grâce aux espaces interquartiles représentés par les barres verticales.

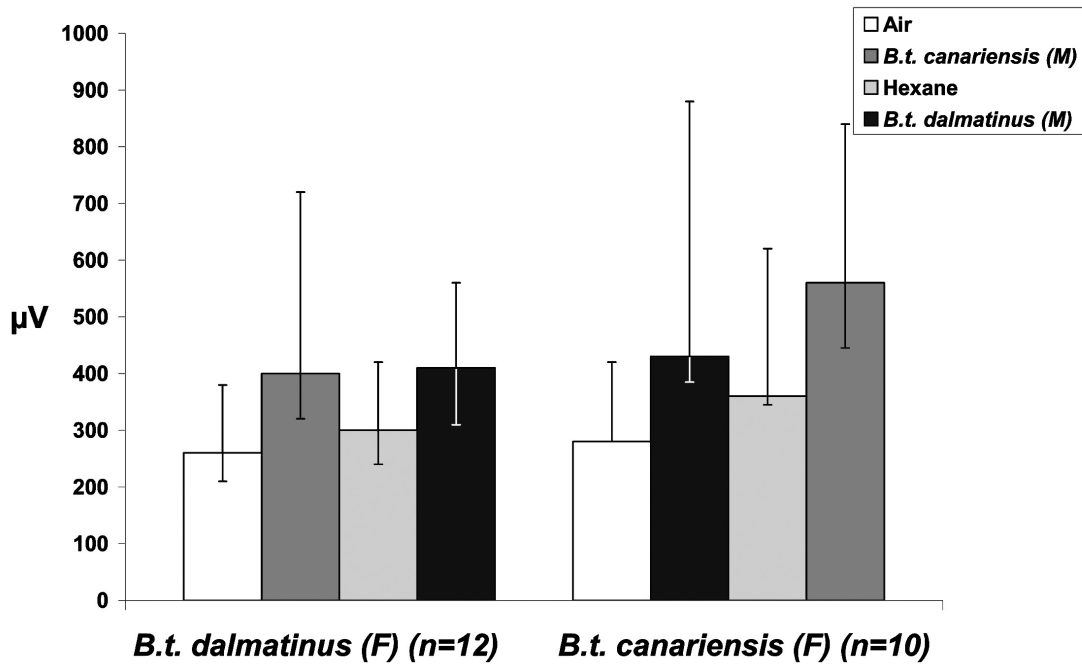


Figure 28. Comparaison des réactions des reines entières de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris canariensis*.

### b) Test de Chi<sup>2</sup>

Le test de chi<sup>2</sup> des 4 sprays sur base de la médiane permet de mettre en évidence si les 4 sprays provoquent chez l'échantillon de reines des ddp significativement différentes.

Le test de chi<sup>2</sup> 2 à 2 toujours sur base de la médiane pour tout l'échantillon met en évidence si les ddp provoquées par 2 sprays sont significativement différentes ou pas. Il est effectué pour chacune des paires de sprays.

- Test de Chi<sup>2</sup> des 4 sprays sur base de la médiane chez *B. t. dalmatinus* (n=12)

Le chi<sup>2</sup> observé (48,10) est supérieur au chi<sup>2</sup> théorique au seuil 99,9% (16,27). On rejette donc l'hypothèse H<sub>0</sub>, qui suppose que les distributions sont identiques. Les distributions sont différentes de manière très hautement significative. Les 4 sprays induisent tous chez les reines de *B. t. dalmatinus* des ddp négatives, différentes de manière très hautement significative les unes des autres.

- Test de Chi<sup>2</sup> des 4 sprays sur base de la médiane chez *B. t. canariensis* (n=10)

Le chi<sup>2</sup> observé (103,74) est supérieur au chi<sup>2</sup> théorique au seuil 99,9% (16,27). On rejette donc l'hypothèse H<sub>0</sub>, qui suppose que les distributions sont identiques.

Les distributions sont différentes de manière très hautement significative. Chez les reines de *B. t. canariensis*, les ddp engendrées par les différents sprays sont de valeurs négatives et différentes de manière très hautement significative.

- Test de  $\chi^2$  des sprays 2 à 2 sur base de la médiane chez *B. t. dalmatinus* (n=12)

Le tableau 6 comprend les résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. dalmatinus*.

**Tableau 6. Résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. dalmatinus*.**

	Air	<i>B. t. canariensis</i> (M)	Hexane	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)
Air	-			
<i>B. t. canariensis</i> (M)	***	-		
Hexane	NS	***	-	
<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	***	NS	***	-

NS: pas de différence significative; \*: différence significative; \*\*: différence hautement significative; \*\*\*: différence très hautement significative.

Chez les reines de *B. t. dalmatinus*, les ddp engendrées par les sprays d'air et d'hexane ne sont pas significativement différentes. On observe la même chose pour les ddp provoquées par les sprays de solutions de glandes labiales céphaliques (GLC) de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis*. Toutes les autres paires de sprays présentent des différences de ddp très hautement significatives.

- Test de  $\chi^2$  des sprays 2 à 2 sur base de la médiane chez *B. t. canariensis* (n=10)

Les résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. canariensis* sont repris dans le tableau 7.

**Tableau 7. Résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. canariensis***

	Air	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	Hexane	<i>B. t. canariensis</i> (M)
Air	-			
<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	***	-		
Hexane	**	*	-	
<i>B. t. canariensis</i> (M)	***	***	***	-

NS: pas de différence significative; \*: différence significative; \*\*: différence hautement significative; \*\*\*: différence très hautement significative.

Chez les reines de *B. t. canariensis*, les ddp engendrées par les sprays d'air et d'hexane sont hautement significativement différentes. Les sprays du bouquet phéromonal

des mâles de *B. t. dalmatinus* n'induisent pas des ddp différentes de manière très hautement significative de celles générées par les sprays d'hexane. Tous les autres résultats du test sont que les ddp des sprays comparés sont différentes de manière très hautement significative.

### 3.1.2. EAG sur antenne

#### 3.1.2.1. Mesure des différences de potentiel

##### a) Reines de *Bombus terrestris dalmatinus*

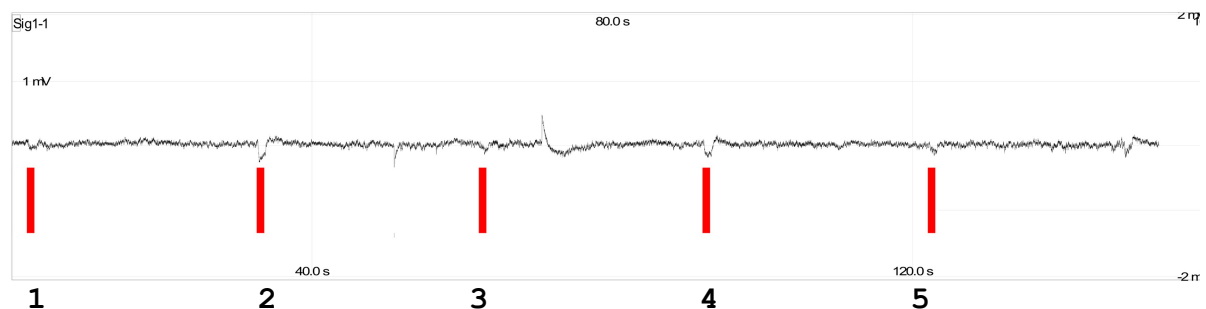
Le tableau 8 résume les observations obtenues en électro-antennographie sur 7 antennes de *B. t. dalmatinus*.

**Tableau 8. Résultats d'électro-antennographie sur 7 antennes de *B. t. dalmatinus***

Nombre d'antennes de <i>B. t. dalmatinus</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. dalmatinus</i>	1
Nombre d'antennes de <i>B. t. dalmatinus</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. canariensis</i>	4
Nombre d'antennes de <i>B. t. dalmatinus</i> qui présentent un autre résultat	2

Il y a 4 antennes de reines de *B. t. dalmatinus* sur 7 qui présentent une ddp supérieure face au spray de solution des GLC de *B. t. canariensis* comparé à celui de leur propre ssp.

Ci-dessous, la figure 29 est un exemple d'électro-antennogramme d'une antenne de *B. t. dalmatinus* exposée à différentes vaporisations.



**Figure 29. Electro-antennogramme de *Bombus terrestris dalmatinus*, antenne de la reine n°77 . Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. canariensis* 117 (2), d'air (3), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *B. t. dalmatinus* 135 (4) et d'air (5).**

L'épaisseur de la ligne de base est moins importante que dans les EAG obtenus sur les reines entières.

La totalité des électro-antennogrammes réalisés sur les antennes des reines de *B. t. dalmatinus* se trouve en annexe 8.3.

Le tableau suivant (tabl. 9) contient les mesures des ddp des antennes des reines de *B. t. dalmatinus* qui suivent chacun des sprays ainsi que les somme, médiane et espace interquartile.

**Tableau 9. Mesures des ddp en électro-antennographie sur antenne de *B. t. dalmatinus* (unité: -  $\mu$ V)**

Reines	Air	<i>B.t. canariensis</i> (M)	Air	<i>B.t. dalmatinus</i> (M)	Air
<i>B.t. dalmatinus</i> R 3B	20	100	20	100	20
<i>B.t. dalmatinus</i> R 38B	160	80	140	60	180
<i>B.t. dalmatinus</i> R 77B	60	260	160	180	160
<i>B.t. dalmatinus</i> R 38B	80	220	80	160	120
<i>B.t. dalmatinus</i> R 7B	120	260	120	180	60
<i>B.t. dalmatinus</i> R 49BI	80	100	100	120	100
<i>B.t. dalmatinus</i> R 23B	60	180	80	160	140
<b>Somme</b>	<b>580</b>	<b>1200</b>	<b>700</b>	<b>960</b>	<b>780</b>
<b>Médiane</b>	<b>80</b>	<b>180</b>	<b>100</b>	<b>160</b>	<b>120</b>
<b>1er Quartile</b>	<b>65</b>	<b>120</b>	<b>85</b>	<b>120</b>	<b>105</b>
<b>4ème Quartile</b>	<b>160</b>	<b>260</b>	<b>160</b>	<b>180</b>	<b>180</b>

Une variabilité individuelle dans les réactions des reines de *B. t. dalmatinus* face à un spray est également remarquée dans le travail sur les antennes

#### **b) Reines de *Bombus terrestris canariensis***

Les observations réunies lors des expériences d'électro-antennographie sur 5 antennes de reines de *B. t. canariensis* sont reprises dans le tableau 10.

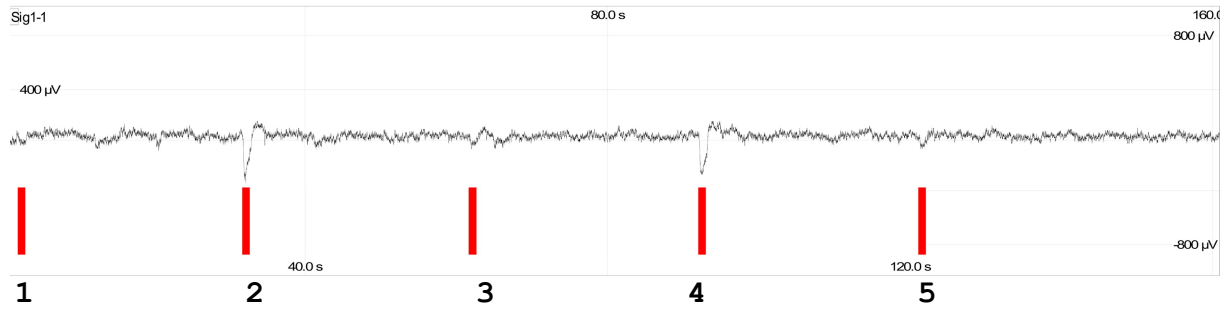
**Tableau 10. Résultats d'électro-antennographie sur 5 antennes de *B. t. canariensis***

Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. canariensis</i>	1
Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de <i>B. t. dalmatinus</i>	3
Nombre de reines de <i>B. t. canariensis</i> qui présentent un autre résultat	1

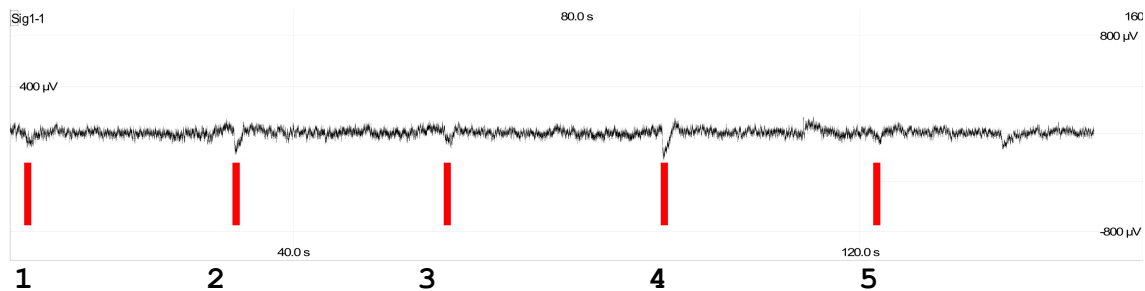
Sur les 5 antennes vaporisées, 3 d'entre elles ont une plus grande ddp face aux sécrétions des mâles de *B. t. dalmatinus* que face à celles des mâles de leur propre sous-espèce.

Ci-dessous, les figures 30 et 31 sont deux exemples d'électro-antennogrammes réalisés sur des antennes de reines de *B. t. canariensis*.





**Figure 30.** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris canariensis*, reine n° 40. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *Bombus terrestris dalmatinus* 135 (2), d'air (3), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *Bombus terrestris canariensis* 115 (4) et d'air (5).



**Figure 31.** Electro-antennogramme de *Bombus terrestris canariensis*, reine n° 36. Vaporisation d'air (1), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *Bombus terrestris dalmatinus* 138 (2), d'air (3), des sécrétions céphaliques d'un mâle de *Bombus terrestris canariensis* 117 (4) et d'air (5).

L'entièreté des électro-antennogrammes enregistrés sur les antennes de reines de *B. t. canariensis* se trouve en annexe 8.4.

Le tableau 11 présente les mesures des ddp effectuées sur les électro-antennogrammes de 5 antennes de reines de *B. t. canariensis*. Il contient aussi les quelques paramètres statistiques utilisés.

**Tableau 11. Mesures des ddp en électro-antennographie sur antenne de *B. t. canariensis* (unité: -  $\mu\text{V}$ )**

Reines	Air	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	Air	<i>B. t. canariensis</i> (M)	Air
<i>B. t. canariensis</i> R_40V	40	320	100	260	80
<i>B. t. canariensis</i> R_36V	100	160	140	200	80
<i>B. t. canariensis</i> R_44V	100	140	80	120	60
<i>B. t. canariensis</i> R_52V	60	200	20	160	40
<i>B. t. canariensis</i> R_38V	20	120	80	120	60
<b>Somme</b>	<b>320</b>	<b>940</b>	<b>420</b>	<b>860</b>	<b>320</b>
<b>Médiane</b>	<b>60</b>	<b>160</b>	<b>80</b>	<b>160</b>	<b>60</b>
<b>1er Quartile</b>	<b>40</b>	<b>140</b>	<b>80</b>	<b>120</b>	<b>60</b>
<b>4ème Quartile</b>	<b>100</b>	<b>320</b>	<b>140</b>	<b>260</b>	<b>80</b>

On remarque à nouveau une variabilité individuelle dans les ddp engendrées par un même spray chez les reines.

### 3.1.2.2. Comparaison des réactions en réponse aux différents sprays

#### a) Représentation graphique

Le graphique suivant représente en parallèle les médianes des différences de potentiel engendrées sur les antennes des deux sous-espèces face aux différents sprays vaporisés (fig. 32).

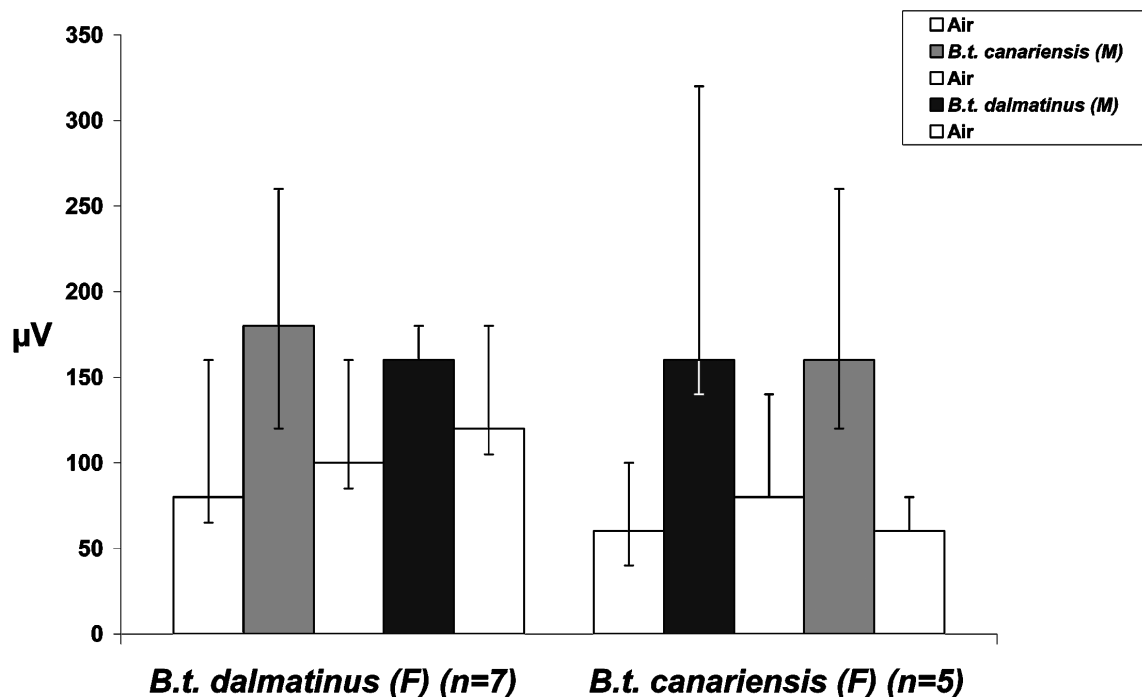


Figure 32. Comparaison des réactions des antennes de *Bombus terrestris dalmatinus* et de *Bombus terrestris canariensis*.

Les réactions des reines des 2 taxons étudiés sont comparées et visualisées sur base de la médiane. La variation individuelle est visualisée grâce aux espaces interquartiles représentés par les barres verticales.

### b) Test de $\chi^2$

- Test de  $\chi^2$  des 5 sprays sur base de la médiane chez *B. t. dalmatinus* (n=7)

Le  $\chi^2$  observé (53,75) est supérieur au  $\chi^2$  théorique au seuil 99,9% (18,46). On rejette donc l'hypothèse  $H_0$ , qui suppose que les distributions sont identiques. Les distributions sont différentes de manière très hautement significative.

- Test de  $\chi^2$  des 5 sprays sur base de la médiane chez *B. t. canariensis* (n=5)

Le  $\chi^2$  observé (103,08) est supérieur au  $\chi^2$  théorique au seuil 99,9% (18,46). On rejette donc l'hypothèse  $H_0$ , qui suppose que les distributions sont identiques.

Les distributions sont différentes de manière très hautement significative.

- Test de  $\chi^2$  des sprays 2 à 2 sur base de la médiane chez *B. t. dalmatinus* (n=7)

Les résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. dalmatinus* sont résumés dans le tableau 12.

**Tableau 12. Résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. dalmatinus***

	Air	<i>B. t. canariensis</i> (M)	Air	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	Air
Air	-				
<i>B. t. canariensis</i> (M)	***	-			
Air	***	***	-		
<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	***	NS	***	-	
Air	***	***	NS	*	-

NS: pas de différence significative; \*: différence significative; \*\*: différence hautement significative; \*\*\*: différence très hautement significative.

Les antennes des reines de *B. t. dalmatinus* ont des ddp non significativement différentes quand elles sont vaporisées par les solutions des GLC de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis*. Un résultat similaire est obtenu pour le deuxième et le troisième spray d'air. Les ddp des deux autres paires de sprays d'air sont pourtant différentes de manière très hautement significative.

- Test de  $\chi^2$  des sprays 2 à 2 sur base de la médiane chez *B. t. canariensis* (n=5)

Le tableau 13 contient les résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. canariensis*.

**Tableau 13. Résultats des tests de  $\chi^2$  2 à 2 pour les reines de *B. t. canariensis***

	Air	<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	Air	<i>B. t. canariensis</i> (M)	Air
Air	-				
<i>B. t. dalmatinus</i> (M)	***	-			
Air	NS	***	-		
<i>B. t. canariensis</i> (M)	***	NS	***	-	
Air	***	***	NS	***	-

NS: pas de différence significative; \*: différence significative; \*\*: différence hautement significative; \*\*\*: différence très hautement significative.

Les ddp induites par les sprays des deux bouquets phéromonaux de mâle sont pour les reines de *B. t. canariensis* non significativement différentes. Il en est de même pour les deux premiers et les deux derniers sprays d'air. Par contre, le premier et le dernier sprays d'air engendrent des ddp différentes de manière très hautement significative.

## 3.2. GC-EAD

### 3.2.1. GC-EAD sur reine entière

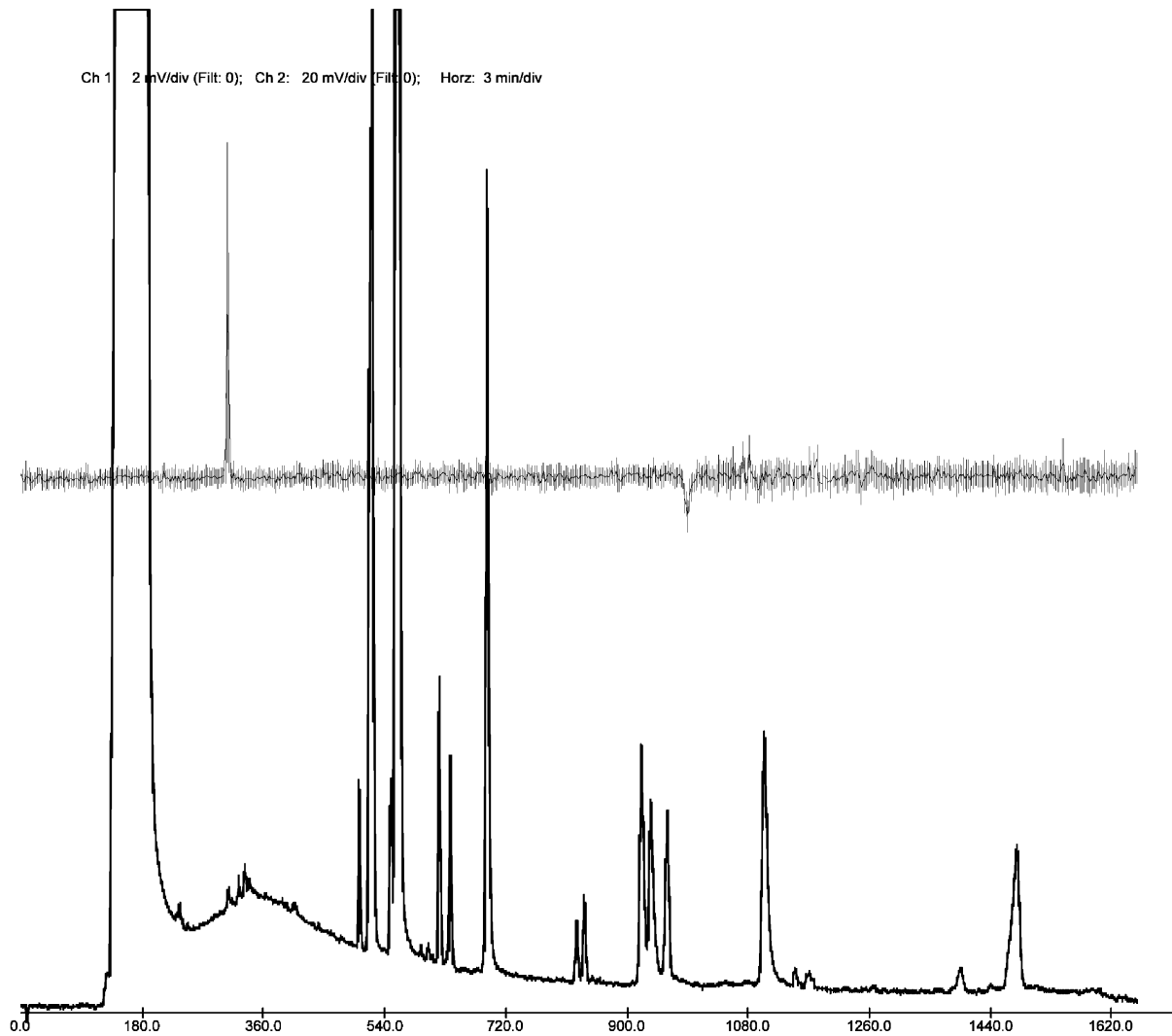
Les lignes de base ont en général oscillé avec des valeurs positives et négatives d'environ 400 $\mu$ V lors des expérimentations en GC-EAD sur des reines entières. Ce bruit de fond constant empêche la visualisation et la mesure d'une quelconque réponse aux composés des GLC.

### 3.2.2. GC-EAD sur antenne

Dans ce cas, les lignes de base oscillent avec des valeurs positives et négatives qui ne s'élèvent plus qu'à 100 $\mu$ V.

La figure 33 est un exemple de chromatogramme couplé à l'électro-antennogramme pour une reine de *B. t. dalmatinus* face aux composés de la solution des GLC d'un mâle de *B. t. dalmatinus*.

Le GC-EAD a enregistré 2 ddp sur l'antenne en réponse à la vaporisation de 2 molécules. La première est une hyperpolarisation qui s'élève à +2,4 mV. Il s'agit pour la seconde d'une dépolarisation d'une valeur de -670  $\mu$ V.



**Figure 33.** Chromatogramme couplé à l'électro-antennogramme d'une antenne de reine de *Bombus terrestris dalmatinus* (n°9) vaporisée par un extrait de mâle de *Bombus terrestris dalmatinus* (n°98). Le profil supérieur correspond à l'électro-antennogramme et le profil inférieur est le chromatogramme.

## 4. Discussion

### 4.1. Electro-antennogrammes

Les résultats d'électro-antennographie nous fournissent tout d'abord diverses informations générales.

#### - Variabilité individuelle

Les différences de potentiel (ddp) obtenues lors des différentes expérimentations et présentées dans les résultats, montrent une grande variabilité individuelle. Ceci est remarqué pour les ddp des reines par rapport à un même spray et ce pour chacun des sprays. De plus, si on compare les ddp provoquées chez un même individu par des solutions de différents mâles, on note généralement une variabilité pour au moins un des sprays. Pour rappel, l'âge des mâles est fixe et est situé entre 7 et 10 jours. Cependant, nous n'avons pas de répétition de l'expérience avec une même reine face aux solutions des mêmes mâles.

Cette variabilité individuelle est observée tout au long de la présente étude. Nous l'avons observée avec les deux sous-espèces utilisées et avec les deux méthodes de travail employées.

Nous pouvons supposer que les difficultés expérimentales causées par la grande variabilité individuelle peuvent être diminuées par un plus grand échantillonnage.

Lors d'une étude sur l'olfaction de *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera, Drosophilidae), Krishnan *et al.* (1999) ont découvert que la sensibilité olfactive de cette dernière suit un rythme circadien. En effet, les réponses antennaires à l'acétate d'éthyl varient en fonction de la période de la journée. Ces réponses sont plus importantes durant une période critique de la nuit, à savoir quand la mouche présente une activité locomotrice réduite ou est dans un état de sommeil. Cette fonction olfactive peut avoir une valeur adaptative, comme réagir à l'approche d'un prédateur durant une période vulnérable ou exploiter une source de nourriture de faible concurrence.

L'existence d'un rythme circadien chez *Drosophila melanogaster* peut éveiller l'hypothèse de la présence d'une variabilité temporelle chez les bourdons. Les mâles de bourdons effectuent leur patrouille de marquage systématiquement le matin. Il pourrait y avoir une valeur adaptative à ce que les reines de bourdons aient leur sensibilité olfactive maximum lorsqu'elles sont susceptibles de trouver des marques de sécrétions de mâles, à savoir dans la matinée.

La confirmation d'une telle hypothèse pourrait peut-être expliquer la variabilité des

réponses d'une même reine sur laquelle on a effectué des expériences au matin et après-midi.

- Résumés des résultats d'EAG

Il y a 7 reines entières de *B. t. dalmatinus* sur 12 qui présentent une différence de potentiel (ddp) supérieure pour les sécrétions des GLC de *B. t. canariensis* que pour les sécrétions de sa propre sous-espèce. Ceci est en accord avec les résultats éthologiques de Mathy (2007). Elle observe que la majorité des reines de *B. t. dalmatinus* ont un comportement agité en présence des sécrétions des GLC de *B. t. canariensis*.

Les reines de *B. t. canariensis* réagissent majoritairement plus aux sécrétions des mâles de leur sous-espèce, 7 reines sur 10 ont une ddp supérieure face au spray de *B. t. canariensis*. Il semble que cette sous-espèce distingue bien les phéromones de ses propres mâles.

## 4.2. Analyses statistiques

- Médianes et espaces interquartiles

Les médianes des ddp montrent que les reines, sous-espèces et méthodes de travail confondues, ont des réactions différentes selon qu'il s'agisse des sprays d'air et d'hexane ou bien des solutions des GLC.

Au sein d'une sous-espèce, l'hexane engendre des réactions supérieures à celles de l'air. Dans le travail sur antenne, les 2 sous-espèces présentent des médianes de ddp différentes pour chacun des sprays d'air.

Contrairement aux résultats bruts de l'EAG discutés ci-dessus, les médianes des ddp des reines entières de *B. t. dalmatinus* semblent similaires face aux 2 types de solutions des GLC.

En accord avec les résultats bruts de l'EAG, les reines de *B. t. canariensis* présentent une médiane de ddp supérieure lorsqu'elles sont vaporisées par les sécrétions des GLC de leur propre sous-espèce.

A l'inverse de ces résultats, la méthode sur antenne donne des médianes de ddp pour *B. t. dalmatinus* différentes pour les 2 types de sécrétions des GLC. La réaction est plus importante pour le spray de *B. t. canariensis*. Les médianes de *B. t. canariensis* semblent cette fois identiques pour les 2 solutions des GLC.

Les espaces interquartiles sont tous considérablement importants. Ils portent à croire que dans certains cas les reines réagissent identiquement à tous les sprays.

Ceci est remarqué pour les 2 sous-espèces ainsi que dans les 2 méthodes de travail, à

l'exception des antennes de *B. t. canariensis*.

Les espaces interquartiles de ces dernières sont plus étroits pour les sprays d'air qu'à l'habitude. Les ddp des sprays d'air varient peu. Dans ce cas, malgré l'espace interquartile, les réactions sont différentes selon que le spray est effectué avec de l'air ou avec une solution des GLC.

- Tests de  $\chi^2$

Tous les tests de  $\chi^2$  qui comparent l'effet des sprays, montrent que tous les sprays engendrent des ddp significativement différentes. Ce qui n'est pas appuyé entièrement par la médiane.

Les tests de  $\chi^2$  de paire sont plus divergents.

Les comparaisons des sprays d'air et d'hexane ou de 2 sprays d'air donnent des résultats différents selon la méthode et la sous-espèce, mais aussi au sein d'une sous-espèce avec les antennes. Les résultats varient de distributions non significativement différentes à des distributions différentes de manière très hautement significative. Autrement dit selon le cas les réactions engendrées par ces sprays peuvent être très similaires comme très distinctes.

Les résultats pour l'air ou l'hexane par rapport aux solutions des GLC sont plus homogènes et les ddp engendrées sont généralement différentes de manière très hautement significative. Il n'y a que 2 exceptions entre l'hexane et la solution des GLC de *B. t. dalmatinus* et cette dernière par rapport à l'air.

Entre les solutions des 2 sous-espèces les résultats sont dans 3 cas sur 4 que les distributions sont non significativement différentes, et que dans un seul des cas les distributions sont différentes de manière très hautement significative. Ce cas isolé est celui des reines entières de *B. t. canariensis*.

On ne retrouve pas dans ces résultats la différence de réaction entre les 2 solutions de mâle chez les reines entières de *B. t. dalmatinus*, comme mis en évidence par la médiane.

Les reines de *B. t. dalmatinus* et de *B. t. canariensis* font une réelle distinction entre l'air ou l'hexane et les sécrétions de mâles. Mais d'après les tests de  $\chi^2$  d'un spray par rapport à un autre, seul les reines entières de *B. t. canariensis* font une différence entre les sécrétions de leurs mâles et celles de la sous-espèce *B. t. dalmatinus*. Ceci est discuté par après au point 4.5.



### 4.3. GC-EAD

Les expérimentations en GC-EAD mènent à la conclusion que de nombreux facteurs sont limitants.

Le matériel biologique mâle doit être très frais. Malgré la conservation des GLC dans des flacons placés au congélateur, la dégradation au cours du temps a toujours lieu.

Les expérimentations en GC-EAD sur des individus vivants présentent une ligne de base trop épaisse que pour en extraire une réponse à un composé. De plus le temps passé dans la pâte à modeler est approximativement de 35 minutes. La reine finit par s'agiter et l'épaisseur ainsi que la régularité de la ligne de base s'en ressentent. Les valeurs positives et négatives de cette ligne atteignent environ 400  $\mu\text{V}$ . La ligne de base obtenue avec les antennes présente des valeurs d'environ 100  $\mu\text{V}$ .

Il semble que l'âge de la reine soit aussi important que celui du mâle. On peut soupçonner que les reines d'un certain âge ne répondent plus aussi bien aux phéromones nuptiales. Il serait donc judicieux de faire une étude comparative des âges comme réalisée pour les mâles (Ågren *et al.*, 1979; Coppée, 2005; Šobotník *et al.*, in prep.), chez les reines. Cela permettrait de trouver l'âge de la reine auquel elle présente les meilleures réponses aux diverses sécrétions.

Il semble par contre que l'état de fécondité des reines importe peu en GC-EAD ainsi qu'en EAG.

Les résultats ici obtenus sont cruciaux pour la mise en place d'un protocole expérimental plus adapté. Ils ont par contre retardé l'obtention de GC-EAD complets et clairs comme souhaités. Les GC-EAD obtenus ne sont pas de bonne qualité au vu des facteurs limitants vus précédemment.

### 4.4. Choix de la méthode de travail

Verheggen *et al.* (2007) présentent une étude dont la partie électro-antennographique est effectuée avec des antennes seules. Ils notent que la qualité des réponses antennaires se dégrade avec le temps.

Verheggen *et al.* (soumis) présentent une étude d'électro-antennographie sur des syrphes avec un protocole similaire adapté à cet insecte.

Šobotník *et al.* (in prep.) travaillent également sur *Bombus terrestris*. Ils n'emploient pour ce faire que la méthode de travail sur antenne seule.

En conclusion, la plupart des travaux effectués jusqu'ici ne se font que sur des antennes détachées.

La présente étude a débuté en travaillant sur des reines entières isolées et immobilisées dans la pâte à modeler. Ce protocole avait permis de conserver le matériel biologique vivant et donc réutilisable. Au vu de la trop importante épaisseur de la ligne de base avec ce protocole, on a tenté de travailler avec les antennes détachées. On peut comparer l'épaisseur de la ligne de base des 2 méthodes. On remarque à vue d'oeil que la méthode sur antenne coupée permet d'obtenir des lignes de bases plus nettes, en conservant des différences de potentiel plus marquées.

Il est recommandé pour des travaux futurs, d'utiliser de préférence les antennes détachées.

## 4.5. Intra- et inter-spécificité

### 4.5.1. Notion d'espèce et de sous-espèce

Paterson (1993) voit l'espèce comme l'ensemble des individus qui présentent un même système de recherche et de reconnaissance d'un partenaire sexuel potentiel.

Nous avons précédemment vu que la parade nuptiale des bourdons s'effectue par des biais comportementaux et olfactifs. Un système de recherche et de reconnaissance d'un partenaire sexuel potentiel pour un bourdon est alors un système qui intègre un répertoire comportemental et un bouquet phéromonal propre à chaque espèce.

Terzo *et al.* (2003) mettent en évidence par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), les principaux composés des GLC des espèces de bourdons d'Europe.

Terzo *et al.* (2005) comparent la variabilité des sécrétions des GLC entre deux espèces étroitement liées, *Bombus (Thoracobombus) ruderarius* (Müller) et *B. (T.) sylvarum* (L.) à la variabilité intraspécifique entre les sous-espèces *B. ruderarius ruderarius* et *B. ruderarius montanus* par chromatographie en phase gazeuse. Ils découvrent alors que ces 2 sous-espèces ne peuvent pas être distinguées sur base des sécrétions des GLC alors que les 2 espèces le sont bien.

Les phéromones des 2 sous-espèces traitées diffèrent davantage par la concentration relative de composés majeurs plutôt que par leur composition en molécules.

D'après ceci, il semble que la variabilité des sécrétions entre 2 espèces est supérieure à celle entre 2 sous-espèces. On peut distinguer 2 espèces sur base de la composition de leur

sécrétion des GLC mais cela ne devrait pas être le cas pour 2 sous-espèces. Le fait d'avoir un bouquet phéromonal spécifique devrait permettre à des sous-espèces différentes de reconnaître un conjoint de la même espèce.

D'après Wilson & Brown (1953) les sous-espèces qui appartiennent à une même espèce sont des populations distinctes génétiquement et géographiquement isolées, mais qui peuvent s'accoupler aux zones de contact des distributions. L'accouplement en ces zones de contact nécessite que les individus de sous-espèces différentes partagent le SMRS propre à l'espèce.

La composition des sécrétions des GLC a une grande importance dans le SMRS des bourdons. Coppée (2006) analyse par GC-MS les solutions des GLC de 4 sous-espèces de *Bombus terrestris*: ssp. *terrestris*, ssp. *lusitanicus*, ssp. *sassaricus* et ssp. *dalmatinus*. Elle observe que chacune des sous-espèces comprend la molécule majeure, le 2,3-dihydro-6-transfarnésol (DHF), mais avec une variation de l'abondance relative. Néanmoins d'autres composés majeurs et mineurs présentent des variations d'une sous-espèce à l'autre ou disparaissent.

Malgré les quelques différences, le statut sub-spécifique des 4 taxons est validé par la composition des sécrétions des GLC. L'hypothèse alors avancée est que cette espèce possède peut-être une conformation en *Artenkreiss* comme chez le Goéland argenté.

En effet, il existe une forme de spéciation définie par Rensch en 1933 qui se nomme *Artenkreiss* ou encore cercle d'espèces. L'exemple type de cette spéciation est le cas du Goéland argenté (Stresemann & Timofeeff-Ressovsky, 1947). Les différentes populations de cette espèce se distribuent le long du cercle arctique. Elles se différencient par des petites nuances de gris dans le plumage. Les populations voisines sont fertiles entre-elles, mais celles qui sont trop éloignées ne le sont plus. Les causes éventuelles de ce phénomène sont de petites variations interpopulationnelles de SMRS qui perturbent la reconnaissance spécifique.

Ceci dit, les résultats d'EAG de la présente étude montrent une relation particulière entre les sous-espèces *dalmatinus* et *canariensis*. Cette dernière reconnaît très bien les sécrétions de ses mâles, alors que *B. t. dalmatinus* réagit plus fortement aux phéromones de *B. t. canariensis*.

Les réactions d'une reine par rapport aux sécrétions d'un mâle sont également traitées par l'éthologie. Les effets des phéromones d'activités nuptiales peuvent être attractants, arrêtants (Wyatt, 2003) et aphrodisiaques (Djegham *et al.*, 1993). Les observations obtenues par Mathy (2007) avec les reines *B. t. dalmatinus* n'expliquent pas nos résultats par d'éventuels effets attractants ou arrêtants.

Les phéromones de la sous-espèce *B. t. canariensis* engendrent des différences de potentiel supérieures chez la majorité des reines des 2 taxons traités, mais elles ne présentent pas les effets éthologiques attendus d'une phéromone chez celles de *B. t. dalmatinus*.

Une hypothèse probable est que de petites variations génétiques aient provoqué un changement de la composition des sécrétions des GLC des mâles de *B. t. canariensis*.

Les analyses par GC-MS de ces sécrétions sont actuellement en cours. Dans l'attente de ces résultats nous pourrions supposer que le composé majeur y est présent dans une concentration relativement supérieure à celle des sécrétions des autres sous-espèces de *Bombus terrestris*.

Une autre hypothèse imaginable serait qu'un composé mineur ou qu'un second composé majeur présent chez *B. t. canariensis* provoque des réactions chez les reines des 2 sous-espèces. Un tel composé hypothétique jouerait son rôle de phéromone d'activités nuptiales chez les reines de sa propre sous-espèce mais pas chez *B. t. dalmatinus*.

L'aspect non explicable par cette hypothèse est que les reines de *B. t. dalmatinus* en majorité (7/10) sont en mouvement durant l'expérience éthologique de Mathy (2007).

Ces résultats inattendus pour l'étude de 2 sous-espèces peuvent également être explicables par l'hypothèse de l'*Artenkreiss*.

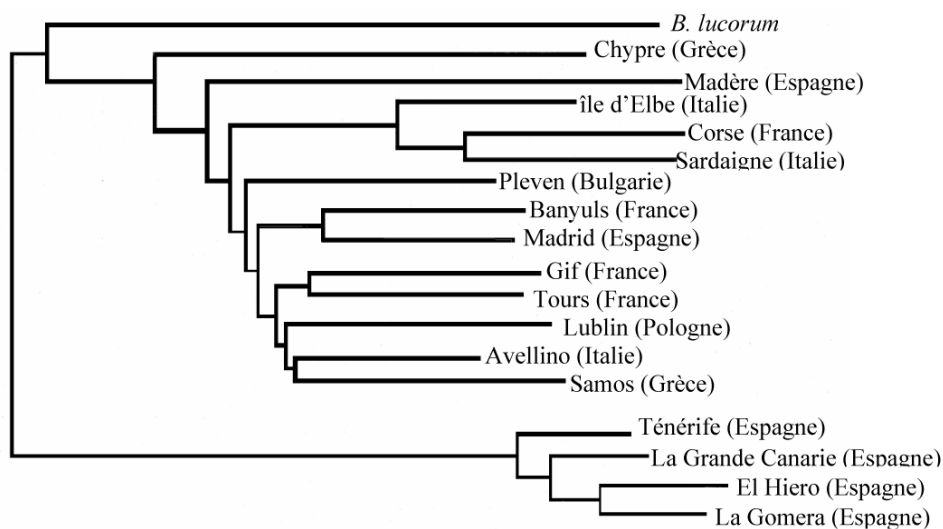
Ces 2 sous-espèces ont des aires de distributions qui ne présentent pas de zone de contact (Rasmont, 1983). La rencontre aléatoire d'individus de ces 2 sous-espèces n'est pas possible. Les hybridations en conditions naturelles sont improbables. L'hypothèse de la conformation en *Artenkreiss* est d'autant plus crédible.

#### **4.5.2. Distance génétique entre *B. t. dalmatinus* et *B. t. canariensis***

De Jonghe (1982), De Jonghe & Rasmont (1983) et Rasmont & De Jonghe (1985) font le point sur le statut des bourdons du sous-genre *Bombus* Latreille, 1802 *sensu stricto* (= *Terrestribombus* Vogt, 1911). Des études centrées sur la distribution géographique, sur l'écologie et sur la phénologie des bourdons anciennement considérés comme *Bombus terrestris* appartiennent aux 4 bonnes espèces suivantes: *B. terrestris* (L., 1758) *sensu stricto*, *B. lucorum* (L., 1761), *B. cryptarum* (Fabricius, 1775) et *B. magnus* Vogt, 1911. Des essais d'hybridation en captivité montrent que les accouplements interspécifiques de *B. lucorum*, *B. cryptarum* et de *B. magnus* sont stériles par mortalité des zygotes.

De Jonghe (1986) effectue des expériences d'hybridation avec *B. terrestris terrestris* (L., 1758) et *B. terrestris xanthopus* Kriechbaumer, 1870. Il observe en captivité des copulations entre les reines de *terrestris* et les mâles de *xanthopus* et vice versa, ainsi qu'entre des reines de F1 et les mâles de *terrestris* ou de *xanthopus* ou encore les mâles de F1. En captivité, l'hybridation entre ces 2 sous-espèces ne présente donc pas de limite de stérilité.

Rasmont & Quaranta (1997) étudient les bourdons de l'Archipel Toscan dont *B. t. terrestris* et *B. t. xanthopus* font partie. D'après le matériel de Krüger (1954) et le leur, il y a une forte hybridation entre les 2 sous-espèces sur l'île d'Elbe. On ignore toujours laquelle de ces sous-espèces est la population primitive de l'île d'Elbe.



**Figure 34. Distances génétiques entre populations de *Bombus terrestris*.** Dendrogramme (non-enraciné) obtenu par la méthode du Neighbor-Joining basé sur les mesures de distances de Cavalli-Sforza & Edward's (1967) relatif aux populations continentales et insulaires de *Bombus terrestris*, *Bombus terrestris canariensis* et *Bombus terrestris maderensis*. Les distances génétiques sont estimées pour 6 loci microsatellites. (d'après Widmer *et al.*, 1998).

Pamilo *et al.* (1997) combinent des études phéromonales aux études génétiques sur enzymes sur le complexe d'espèces *B. lucorum*. Ces auteurs remarquent une corrélation claire entre les types électrophorétiques, phéromonaux et morphologiquement. Ils distinguent le type électrophorétique *B. cryptarum/magnus* et le type *B. lucorum*. Bertsch *et al.* (1997) et Valterová *et al.* (2002) permettent de préciser que les différents chromatogrammes des sécrétions de GLC observés correspondent bien aux espèces *lucorum*, *magnus* et *cryptarum* reconnues auparavant par Rasmont (1984).

Le dendrogramme qu'effectuent Widmer *et al.* (1998) entre quelques populations de l'espèce *B. terrestris*, illustre les distances génétiques entre celles-ci (fig. 34). Les populations de *B. t. canariensis* sont séparées de toutes les autres dès la base de l'arbre. Au contraire, les populations de *B. t. dalmatinus* étudiées par ces auteurs sont entremêlées avec les autres sous-

espèces de *B. terrestris*. Ceci est cohérent avec les réactions différenciées de *B. t. canariensis* vis-à-vis de *B. t. dalmatinus*.

Comme c'est le cas pour *B. lucorum*, il est imaginable que l'espèce *B. terrestris* soit un complexe d'espèces qui se subdivise d'un point de vue phéromonal et génétique.

## 5. Conclusion

Deux protocoles différents ont été mis au point. Le premier est basé sur l'emploi de reines vivantes. Le second est basé sur l'utilisation des seules antennes fraîchement détachées de l'animal. Le premier protocole permet de renouveler l'expérience plusieurs fois mais la ligne de base (bruit de fond) masque beaucoup d'informations. Le second protocole permet d'obtenir une ligne de base bien plus nette mais ne permet pas la réutilisation du matériel biologique.

L'étude par GC-EAD nécessite un protocole et du matériel biologique adaptés, plus exigeants que lors d'expérimentations en EAG. L'identification des composés de sécrétions des GLC qui induisent un stimulus olfactif chez les reines n'a pu être établie ici.

Les reines de *B. t. canariensis* réagissent nettement moins aux mâles de *B. t. dalmatinus* qu'à leurs propres mâles. Au contraire, les réactions les plus élevées des reines de *B. t. dalmatinus* sont en réponse aux sécrétions de *B. t. canariensis*.

Les résultats par EAG, additionnés au fait que les deux taxons sont génétiquement et géographiquement éloignés confortent l'hypothèse que l'espèce étudiée est composite.

## 6. Perspectives

Le concept de sous-espèce est très complexe chez les bourdons. Il est intéressant d'avoir un maximum d'outils pour étudier ce concept. Les composés moléculaires sont connus, mais il serait judicieux de connaître quelle est la part phéromonale des sécrétions perçue par la reine dans la reconnaissance de son partenaire. Les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplée à l'électro-antennographie (GC-EAD) effectuées avec un protocole amélioré, sont indispensables dans des cas comme celui de *B. terrestris*.

Il serait très instructif d'effectuer la copulation en captivité entre les taxons de *B. terrestris* tels que *B. t. dalmatinus* et *B. t. canariensis*.

D'autre part, de nouvelles analyses génétiques de ces mêmes taxons permettraient d'avoir un troisième point d'appui pour la mise au clair des relations entre ceux-ci.

## 7. Bibliographie

- Ache B.W., 1994.** Toward a common strategy for transducing olfactory information. *Seminars Cell Biology*, **5**:55-63.
- Ågren L., Cederberg B. & Svensson Bo G., 1979.** Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae). *Zoon*, **7**:1-14.
- Almaas T. J. & Mustaparta H., 1991.** *Heliothis virescens*: response characteristics of receptor neurons in *sensilla trichodea* Type 1 and Type 2. *Chemical Ecology*, **17**:953-972.
- Bear M. F., Connors B. W. & Paradiso M. A., 1997.** *Neurosciences: à la découverte du cerveau*. Pradel, Masson-Williams & Wilkins France, Paris, 654 p.
- Bellés X., Galofré A. & Ginebreda A., 1987.** Taxonomic potential of the chemical constituents in the cephalic marking secretions of *Bombus* and *Psithyrus* species (Hymenoptera, Apidae): a numeral taxonomic study. *Apidologie*, **18**:231-242.
- Belluscio L., Gold G .H., Nemes A. & Axel R., 1998.** Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron*, **20**:69-81.
- Bergman P., 1997.** *Chemical communication in bumblebee premating behaviour*. Ph.D. Thesis, Göteborg University, Sweden.
- Bergström G., 1980.** Complexity of exocrine signals in aculeate Hymenoptera. P 35-47 in: *Les Pheromones sexuelles et les médiateurs chimiques chez les insectes: utilisation en lutte intégrée* Les colloques de l'INRA, Colmar, 25-27 novembre 1980.
- Bergström G., Appelgren M., Svensson Bo G., Ågren L., Descoins C., Frerot B., Gallois M. & Lettere M., 1985.** Marking pheromones of *Megabombus sylvarum* (L.) and *M. ruderarius* (Müller) males (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie*, **16** (1):57-68.
- Bergström G., Svensson B. G., Appelgren M. & Groth I., 1981.** Complexity of bumble bee marking pheromones: biochemical, ecological and systematical interpretations. *Systematics Association*, **19**:175-183.
- Bertsch A., 1997.** Abgrenzung der Hummel-Arten *Bombus cryptarum* und *B. lucorum* mittels männlicher Labialdrüsen-Sekrete und morphologischer Merkmale (Hymenoptera, Apidae). *Entomology Gener*, **22** (2):129-145.
- Borroni P. F. & O'Connell R. J., 1992.** Temporal analysis of adaptation in moth (*Trichoplusia ni*) pheromone receptor neurons. *Journal of Comparative Physiology A*, **170**:691-700.
- Calam D. H., 1969.** Species and sex-specific compounds from the heads of male bumblebees (*Bombus* ssp.). *Nature*, **221**:856-857.
- Cassier P., Bonatier J., Descoins C. & Nagnan-Le Meillour P., 2000.** *Communication chimique et environnement*. Sciences, Belin, Paris, 256 p.



- Cederberg, B., Svensson Bo G., Bergström G., Appelgren M. & Groth I., 1984.** Male marking Pheromones in North European Cuckoo Bumble Bees *Psithyrus* (Hymenoptera, Apidae). *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis*, **3**:161-166.
- Coppée A., 2005.** *Caractérisation des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae) en fonction de l'âge.* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 50 p.
- Coppée A., 2006.** *Caractérisation de la variabilité intraspécifique des sécrétions des glandes labiales céphaliques de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae).* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 56 p.
- De Jonghe R. 1982.** Copulations interspécifiques en captivité d'espèces du genre *Bombus* Latreille (*sensu stricto*) (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Bulletin des Annales de la Société Royale belge d'Entomologie*, **118**:173-175.
- De Jonghe R., 1986.** Crossing experiments with *Bombus terrestris terrestris* (Linnaeus, 1758) and *Bombus terrestris xanthopus* Kriechbaumer, 1870 and some notes on diapause and nose-lose (Hymenoptera: Apoidea). *Phegea, Antwerpen*, **14**(1):19-23.
- De Jonghe R. & Rasmont P., 1983.** Kreuzungsexperimente mit Hummeln des Genus *Bombus* Latreille *sensu stricto*. (Hymenoptera, Apidae). *Phegea, Antwerpen*, **11**:7-10.
- Djegham Y., Verhaeghe J.C. & Rasmont P., 1993.** Copulation of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) in captivity. *Journal of Apicultural Research*, **33**(1):15-20.
- Galizia C. G. & Menzel R., 2000.** Odour perception in honeybees: coding information in glomerular patterns. *Current Opinion in Neurobiology*, **10** (4):504-510.
- Galizia, C. G. & Vetter, R., 2004.** Optical Methods for Analyzing Odor-Evoked Activity in the Insect Brain. P. 350-392 in: **Christensen, T.A. (Ed).** *Methods in insect sensory neuroscience*. CRC Press, Londres, 435 p.
- Haas A., 1949.** Arttypische Flugbahnen von Hummelmännchen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie*, **31**:281-307.
- Haas A., 1967.** Vergleichende Verhaltensstudien zum Paarungsschwarm der Hummeln (*Bombus*) und Schmarotzerhummeln (*Psithyrus*). *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **24**: 257–277.
- Heinbockel T. & Kaissling K-E., 1996.** Variability of olfactory receptor neuron responses of female silkworms (*Bombyx mori* L.) to benzoic acid and (±)-linalool. *Journal of Insect Physiology A*, **181**:469-476.
- Hildebrand J. G., 1995.** Analysis of chemical signals by nervous systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **92**:67-74.
- Hildebrand J. G. & Shepherd G.M., 1997.** Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. *Annual Reviews-Neuroscience*, **20**:595-361.
- Homberg U., 2004.** Multisensory Processing in the Insect Brain. p. 3-25 in: **Christensen, T.A. (Ed).** *Methods in Insect Sensory Neuroscience*. CRC Press, Londres, 435 p.
- Hovorka O., Urbanová K. & Valterová I. 1998.** Premating behavior of *Bombus confusus* males and analysis of their labial gland secretion. *Journal of Chemical Ecology*, **24** (1):183-193.

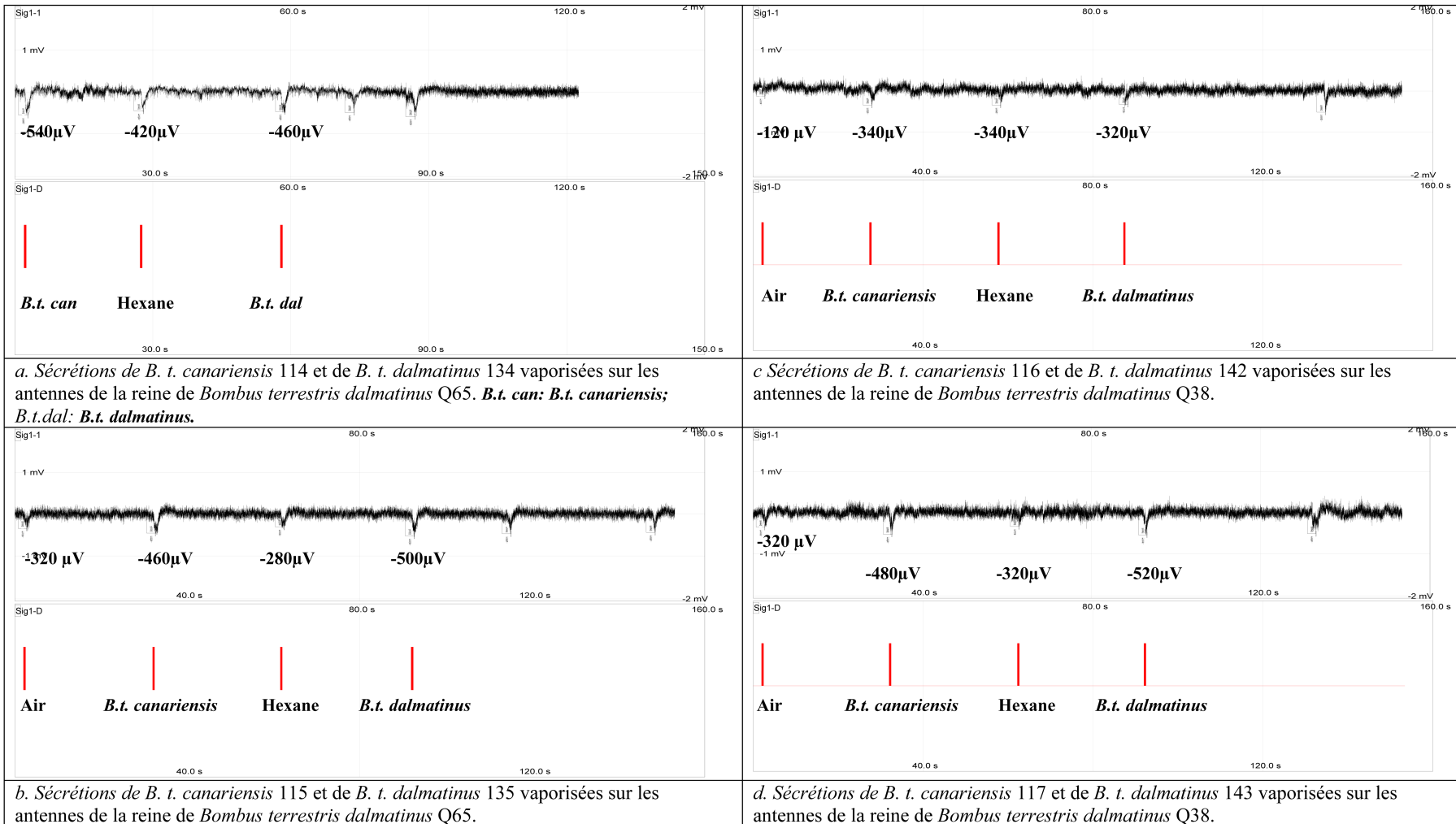
- Jackson B. D. & Morgan E. D., 1993.** Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology*, **4**:125-144.
- Krishnan B., Dryer S. E. & Hardin P. E., 1999.** Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **400**:375-378.
- Kullenberg B., Bergström G., Bringer B., Carlberg B. & Cederberg B., 1973.** Observations on scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. males (Hym., Apidae) and localization of sites of production of the secretion. *Zoon*, Suppl. **1**:23-29.
- Larsson M. C. & Svensson G., 2004.** Methods in Insect Sensory Ecology. P. 28-58 in: **Christensen, T.A. (Ed).** *Methods in insect sensory neuroscience*. CRC Press, Londres, 435 p.
- Mathy T., 2007.** *Préférence des reines vierges de Bombus terrestris L. envers les sécrétions des mâles de différents âges et sous-espèces (Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 73 p.
- Mayr, 1963.** *Animal species and evolution*. The Belknap Press of Harvard University Press, 797 p.
- Nation J. L., 2001.** *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press LLC, 485 p.
- Nojima S., Linn J. C., Morris B., Zhang A. & Roelofs W., 2003.** Identification of host fruit volatiles from hawthorn (*Crataegus spp.*) attractive to hawthorn-origen *Rhagoletis pomonella* flies. *Journal of Chemical Ecology*, **29**:321-336.
- Pamilo P., Tengö J., Rasmont P., Pirhonen K., Pekkarinen A., & Kaarnama E., 1997.** Pheromonal and enzyme genetic characteristics of the *Bombus lucorum* species complex in northern Europe. *Entomologica Fennica*, **7**:187-194.
- Paterson H. E. H., 1985.** The recognition concept of species. *Transvaal Museum Monograph*, **4**:21-29.
- Paterson H. E. H., 1993.** *Evolution and the recognition concept of species*, The Johns Hopkins University Press, 234 p.
- Percy-Cunningham J. E. & MacDonald J. A., 1987.** Biology and ultrastructure of sex pheromone-producing glands. p. 27–69 In: **Prestwich G.D. and Blomquist G.J., (Ed.),** *Pheromone Biochemistry*, Academic Press, Florida.
- Perry J., Dahanukar, A. & Carlson, J., 2004.** Analysis of Taste Receptors in *Drosophila*. P. 239-264 in: **Christensen T.A. (Ed).** *Methods in insect sensory neuroscience*. CRC Press, Londres, 435 p.
- Rasmont P., 1983.** Catalogue commenté des Bourdons de la région ouest-paléarctique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Notes fauniques de Gembloux*, **7**:1-72.
- Rasmont P., 1984.** Les Bourdons du genre *Bombus* Latreille *sensu stricto* en Europe Occidentale et Centrale (Hymenoptera, Apidae). *Spixiana, München*, **7**:135-160.
- Rasmont, P. & Adamski A., 1995.** Les Bourdons de la Corse (Hymenoptera, Apoidea, Bombinae). *Notes fauniques de Gembloux*, **31**:3-87.
- Rasmont P. & Jonghe R. de, 1985.** Progrès récents dans la connaissance des bourdons du genre *Bombus* Latreille *sensu stricto* (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Insectes Sociaux*, **2**:119-122.

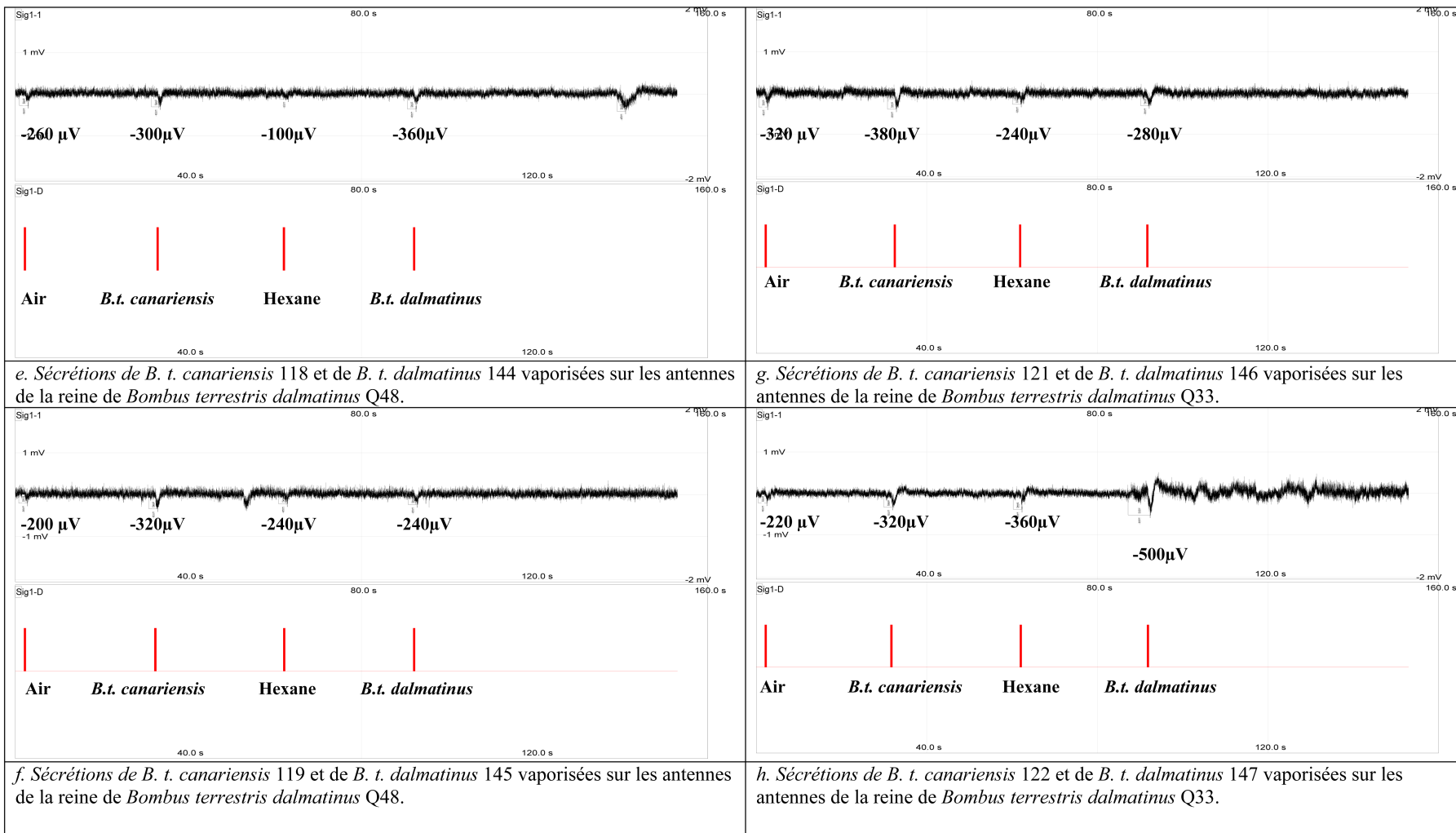
- Rasmont P. & Quaranta M., 1997.** I Bombi dell'Arcipelago Toscano (Hymenoptera Apidae). *Bollettino della Società Entomologica Italiana*, **129** (1):31-38.
- Rasmont P., Terzo M., Aytikin A. M., Hines H., Urbanová K., Cahliková L. & Valterová I., 2005.** Cephalic secretions of bumblebee subgenus *Sibiricobombus* Vogt suggest *Bombus niveatus* Kriechbaumer and *Bombus vorticosus* Gerstaecker are conspecific (Hymenoptera, Apidae, *Bombus*). *Apidologie*, **36**:571-584.
- Rasmont P. & Terzo M., in prep.a.** The species and subspecies concepts in bumblebees, with a check-list of the West-Palaerctic species. *Annales de la Société Entomologique de France*
- Rasmont P. & Terzo M., in prep.b.** *West-Palaearctic Bumblebees*. Apollo Books.
- Rensch B., 1933.** Zoologische Systematik und Artbildungsprobleme. *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft Zoologischer Anzeiger (Supplement)*, **6**:19-83.
- Siegel S. & Castellan N. J., 1988.** *Nonparametric statistics for the Behavioural Sciences*. McGraw-Hill International Edition, 399 p.
- Sinkevich V., 2006.** *Etude comportementale de l'attractivité du 2,3-dihydrofarnesol envers les femelles vierges de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons, 51 p.
- Sladen F. W. L., 1912.** *The Bumble-Bee. Its Life History and How to Domesticate It*. Macmillan & Co., London, 283 p.
- Šobotník J., Kalinová B., Cahliková L., Weyda F., Ptáček V. & Valterová I., in prep.** Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*.
- Stein G., 1962.** Über den Feinbau der Mandibeldrüse von Hummelmännchen. *Zeitschrift für Zellforschung*, **57**:719-736.
- Stresemann E. & Timofeeff-Ressovsky N. W., 1947.** Artentstehung in geographischen Formenkreisen. I. Der Formenkreis *Larus argentatus-cachinnans-fucus*. *Biologisches Zentralblatt*, **66**:57-76.
- Svensson Bo G., 1979.** Patrolling behaviour of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae) in a subalpine/ alpine area, Swedish Lapland. *Zoon*, **7**:67-94.
- Svensson Bo G. & Bergström G. 1977.** Volatile marking secretions from the labial gland of north European *Pyrobombus* D. T. males (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux*, **24** (2):213-224.
- Terzo M., Urbanová K., Valterová I. & Rasmont P., 2005.** Intra and interspecific variability of the cephalic labial glands secretions in male bumblebees: the case of *Bombus (Thoracobombus) ruderarius* and *B. (Thoracobombus) sylvarum* [Hymenoptera, Apidae]. *Apidologie*, **36**:85-96.
- Terzo M., Valterová I., Urbanová K. & Rasmont P., 2003.** De la nécessité de réécrire les phéromones sexuelles des mâles de bourdons [Hymenoptera: Apidae, Bombini] publiées avant 1996 pour leur utilisation en analyse phylogénétique. *Phytoprotection*, **84**:39-49.
- Valterová I., Urbanová K., P. Rasmont & M. Terzo. 2002.** Marking pheromones of bumblebees : composition of the labial gland secretion of males of *Bombus magnus*. P. 175 in: *International Society of Chemical Ecology, 19<sup>th</sup> Annual Meeting, University of Hamburg, Germany, August 3.-7.2002.*, 289 p.

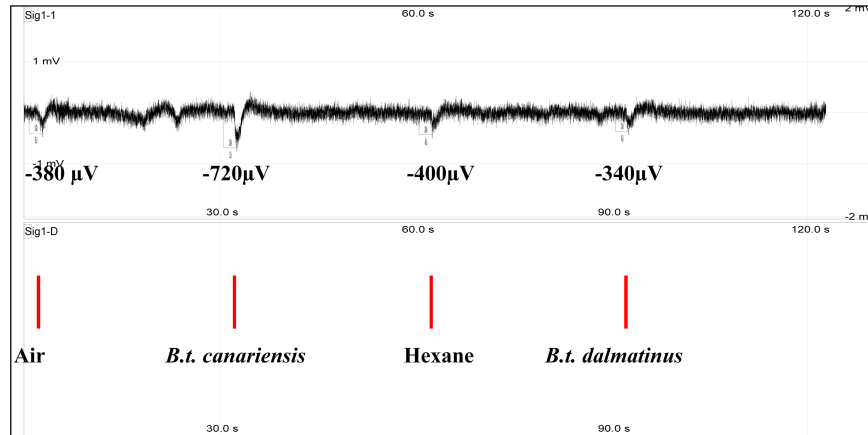
- Verheggen F., Arnaud L., Bartram S., Gohy M. & Haubruge E., soumis a.** Aphid and plant secondary metabolites induce oviposition in an aphidophagous hoverfly. *Journal of Chemical Ecology*.
- Verheggen F., Fagel Q., Heuskin S., Lognay G., Francis F. & Haubruge E., soumis b.** (-)- $\beta$ -caryophyllene, the aggregation pheromone of the multicolored asian lady beetle *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology*.
- Verheggen F., Ryne C., Olsson C., Arnaud L., Lognay G., Persson D., Haubruge E. & Löfstedt C., 2007.** Electrophysiological and behavioural study of some secondary metabolites in the confused flour beetle, *Tribolium confusum*. *Journal of Chemical Ecology*, **33** (3):525-539.
- Widmer A., Schmid-Hempel P., Estoup A. & Scholl A., 1998.** Population genetic structure and colonization history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity*, **81**:563-572.
- Wilson E. O. & Brown W. L., 1953.** The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology*, **2** (3):97-111.
- Wyatt T. D., 2003.** *Pheromones and animal behaviour: communication by smell and taste*. Cambridge University Press, Cambridge, 391p.

## 8. Annexes

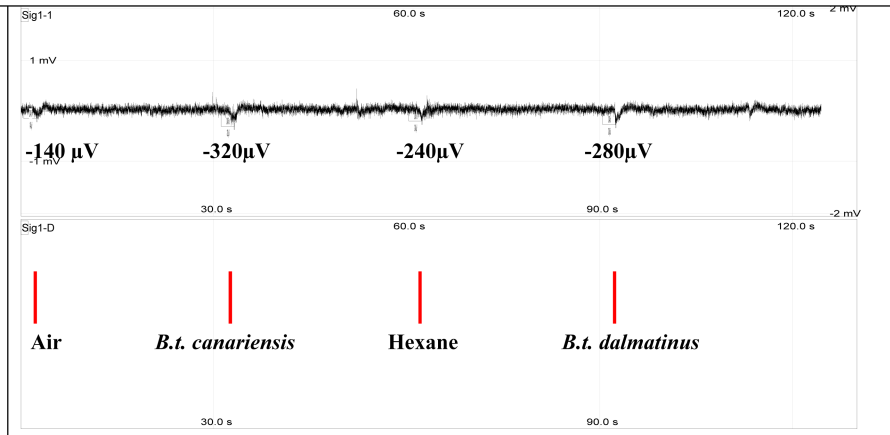
### 8.1. Electro-antennogrammes des reines de *Bombus terrestris dalmatinus*



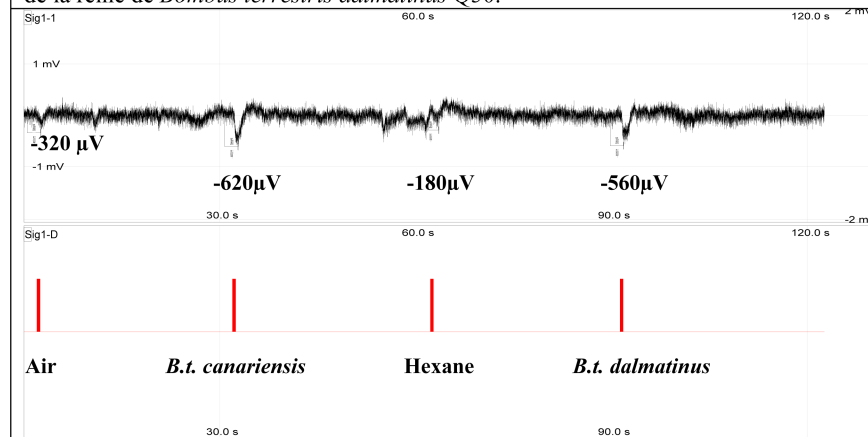




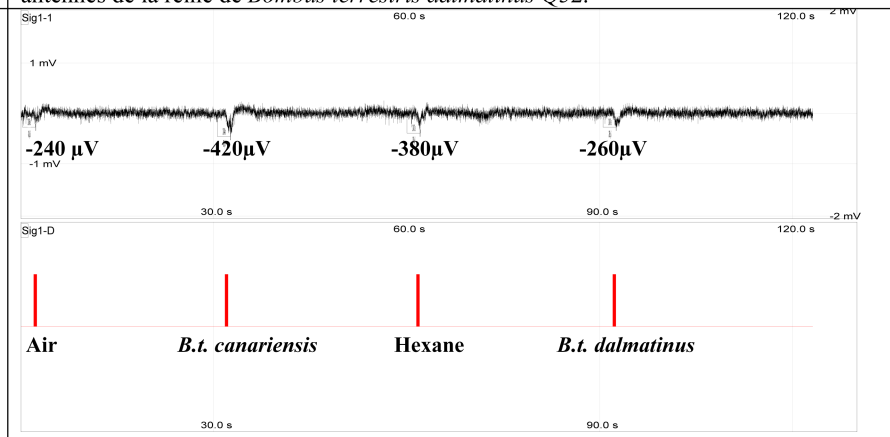
i. Sécérations de *B. t. canariensis* 123 et de *B. t. dalmatinus* 150 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q50.



k. Sécérations de *B. t. canariensis* 125 et de *B. t. dalmatinus* 152 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q52.

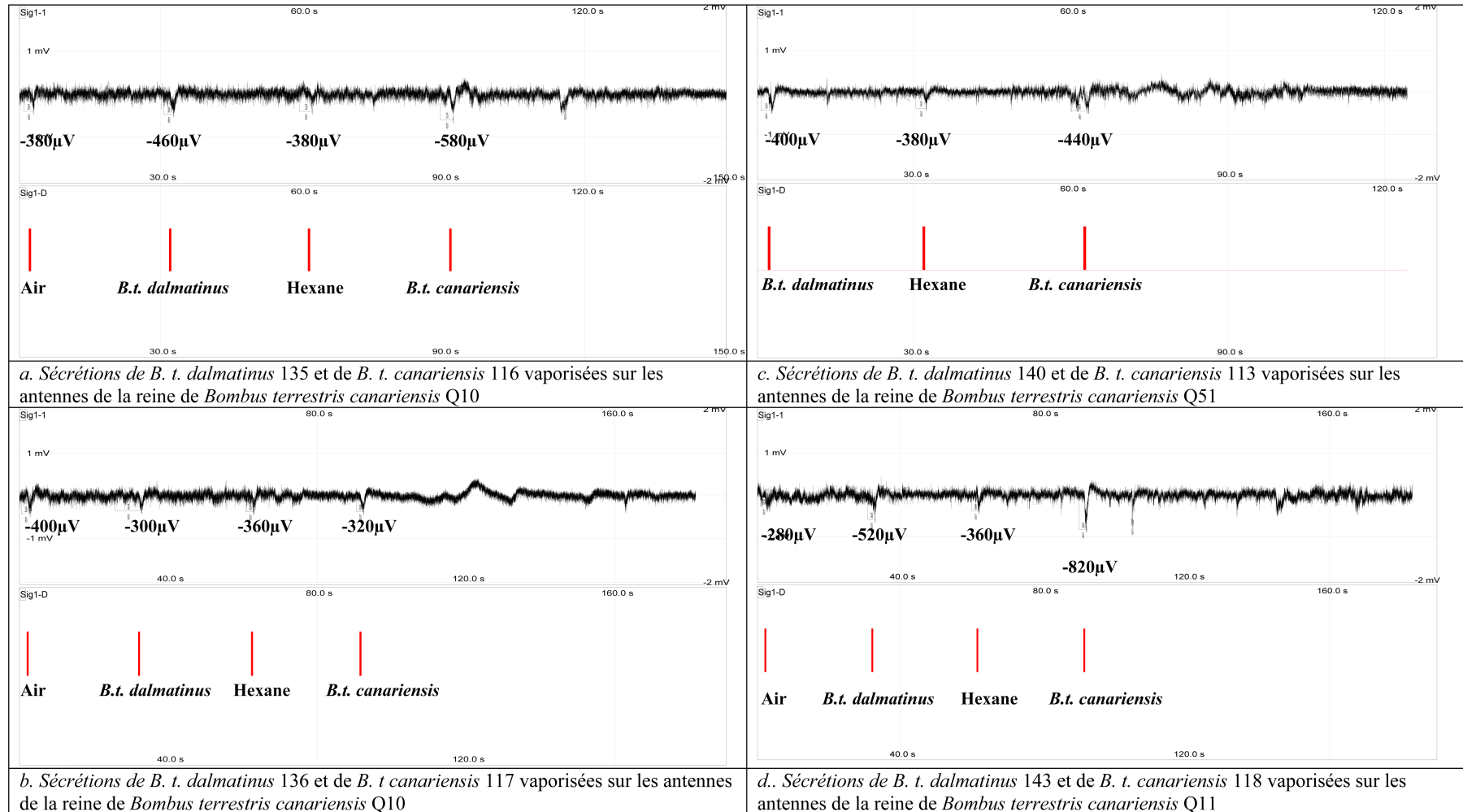


j. Sécérations de *B. t. canariensis* 124 et de *B. t. dalmatinus* 151 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q50.

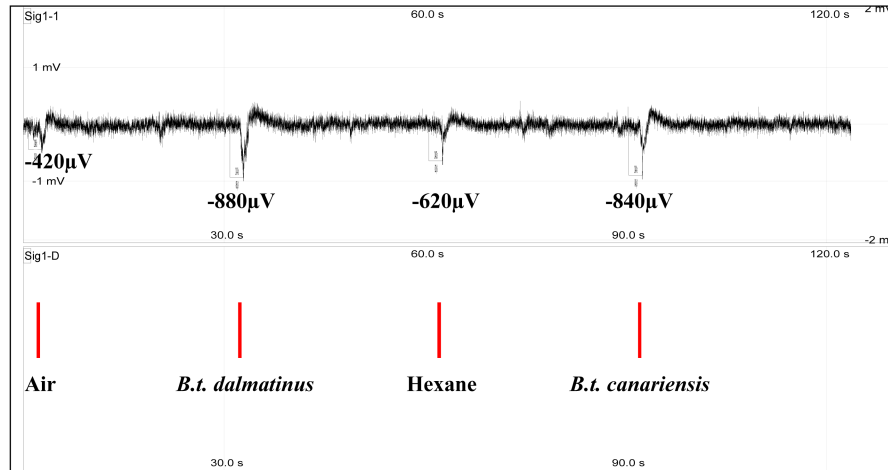


l. Sécérations de *B. t. canariensis* 126 et de *B. t. dalmatinus* 153 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q52.

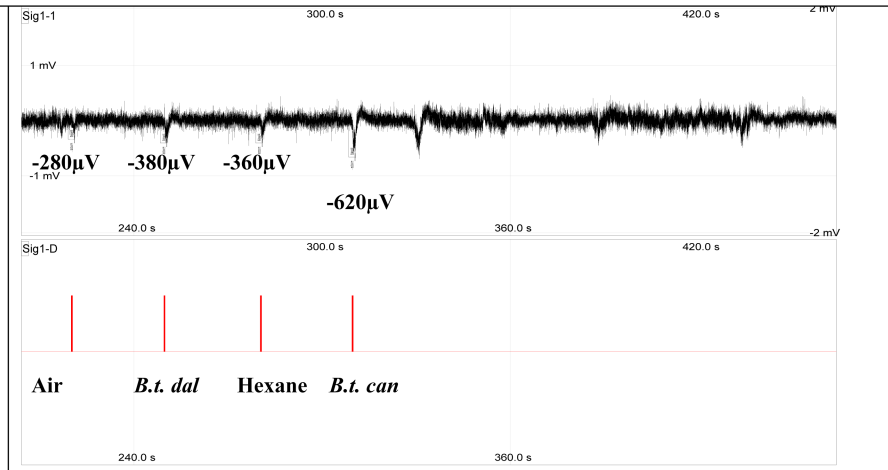
## 8.2. Electro-antennogrammes des reines de *Bombus terrestris canariensis*



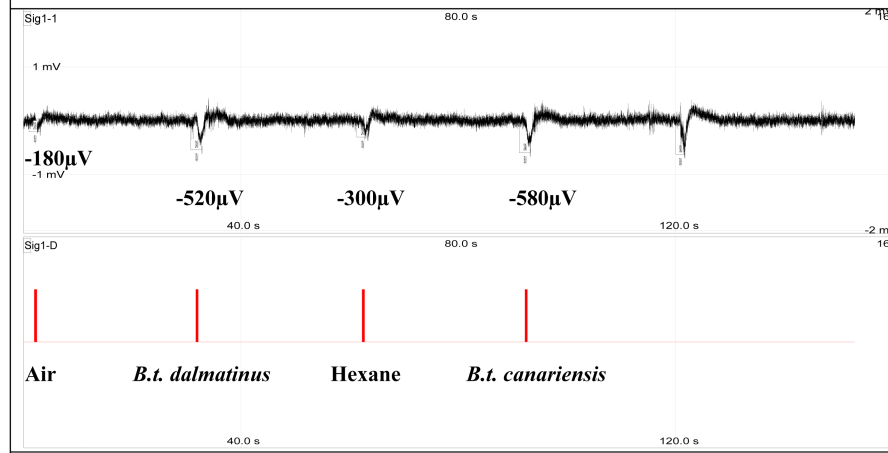




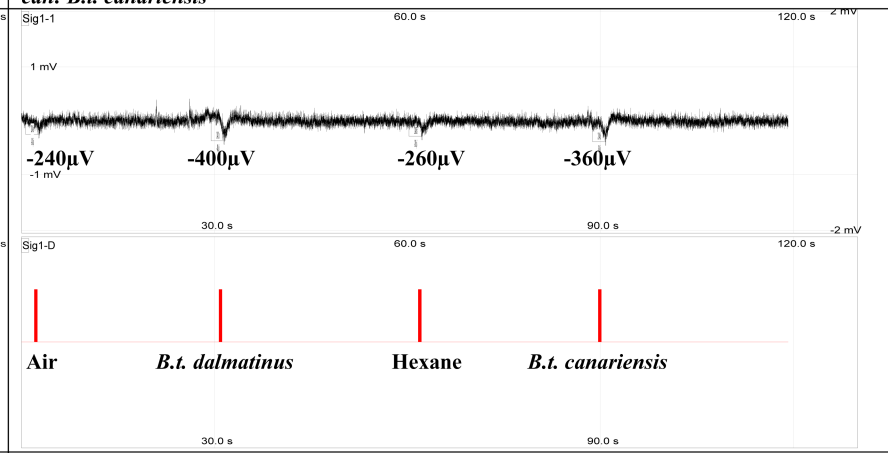
e. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 144 et de *B. t. canariensis* 119 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q11



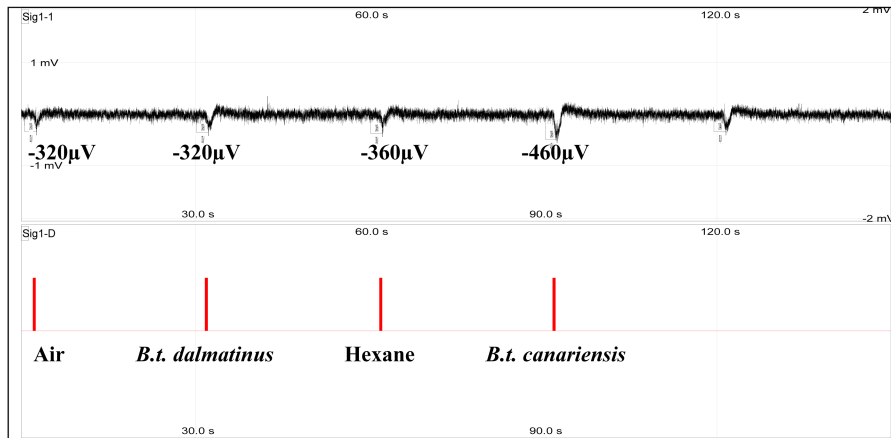
g. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 150 et de *B. t. canariensis* 124 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q36. *B.t.dal*: *B.t. dalmatinus*; *B.t. can*: *B.t. canariensis*



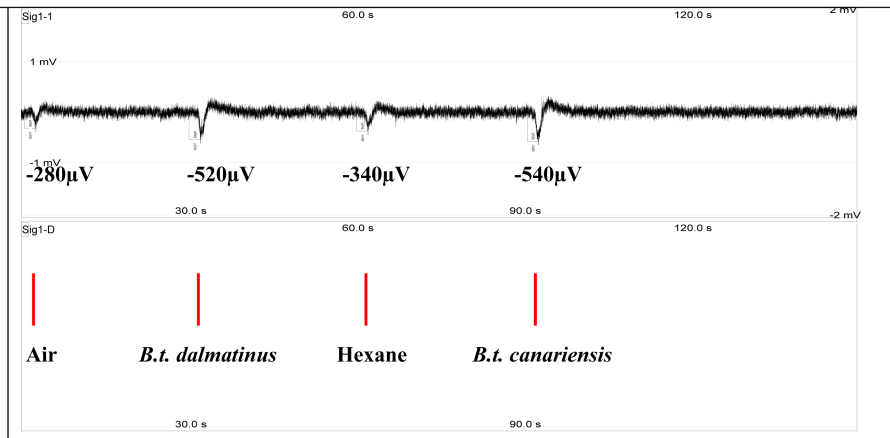
f. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 145 et de *B. t. canariensis* 121 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q12.



h. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 151 et de *B. t. canariensis* 125 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q11

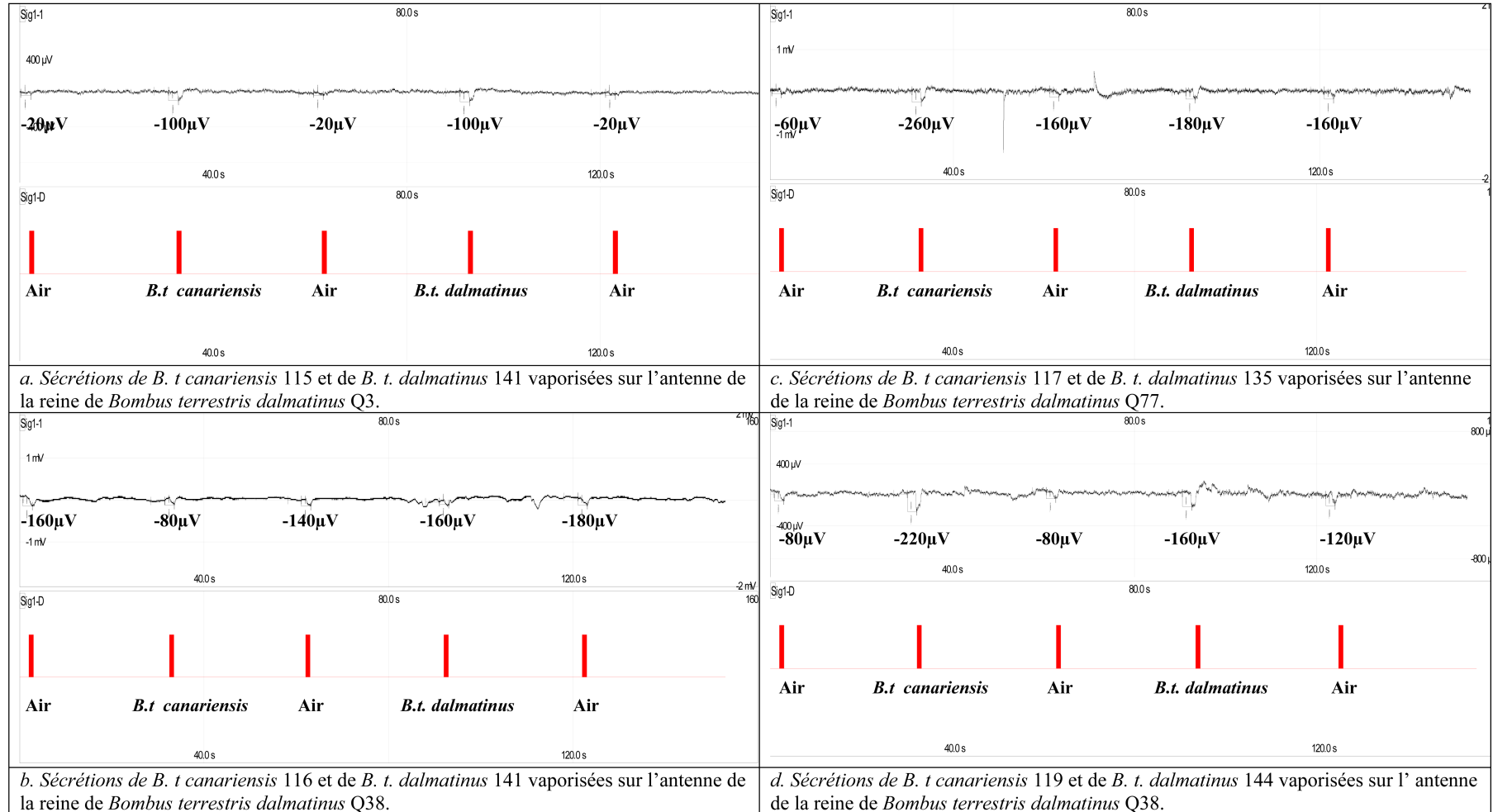


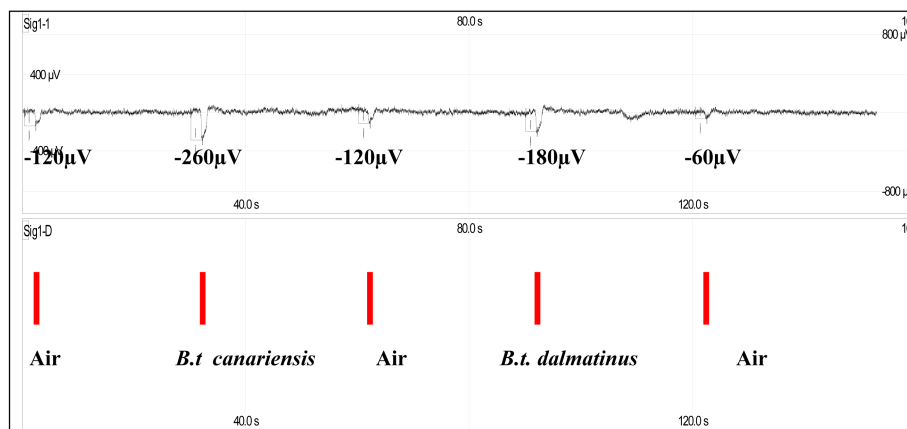
i. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 152 et de *B. t. canariensis* 126 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q37



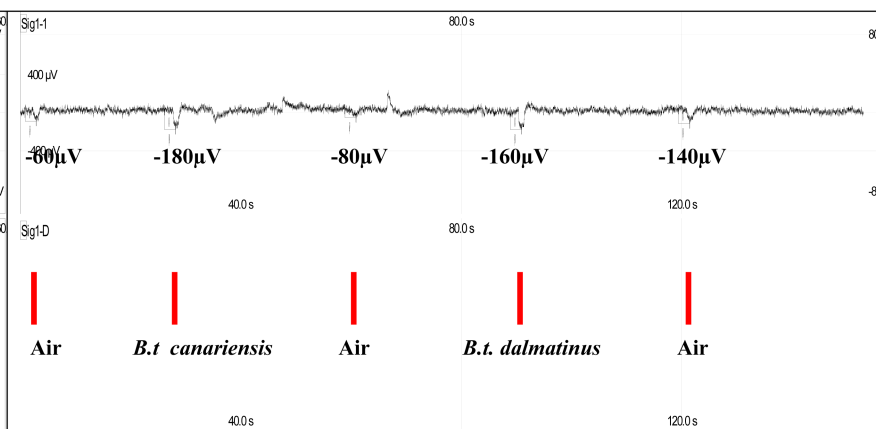
j. Sécrétions de *B. t. dalmatinus* 153 et de *B. t. canariensis* 127 vaporisées sur les antennes de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q21

### 8.3. Electro-antennogrammes de l'antenne des reines de *Bombus terrestris dalmatinus*

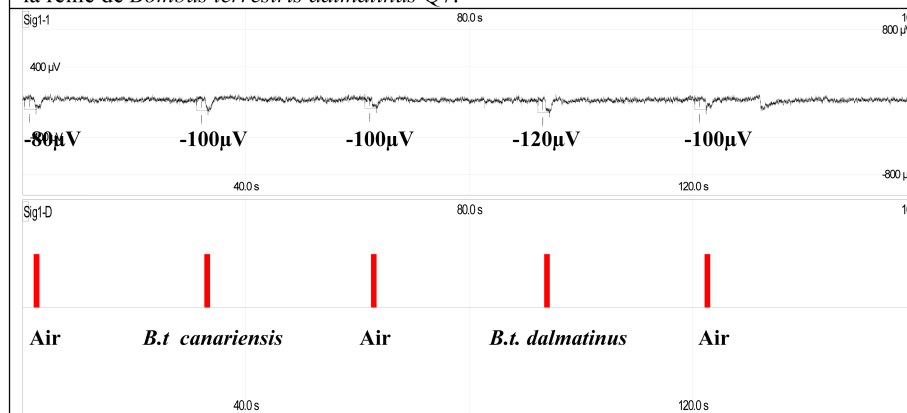




e. Sécrétions de *B. t. canariensis* 124 et de *B. t. dalmatinus* 138 vaporisées sur l'antenne de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q7.

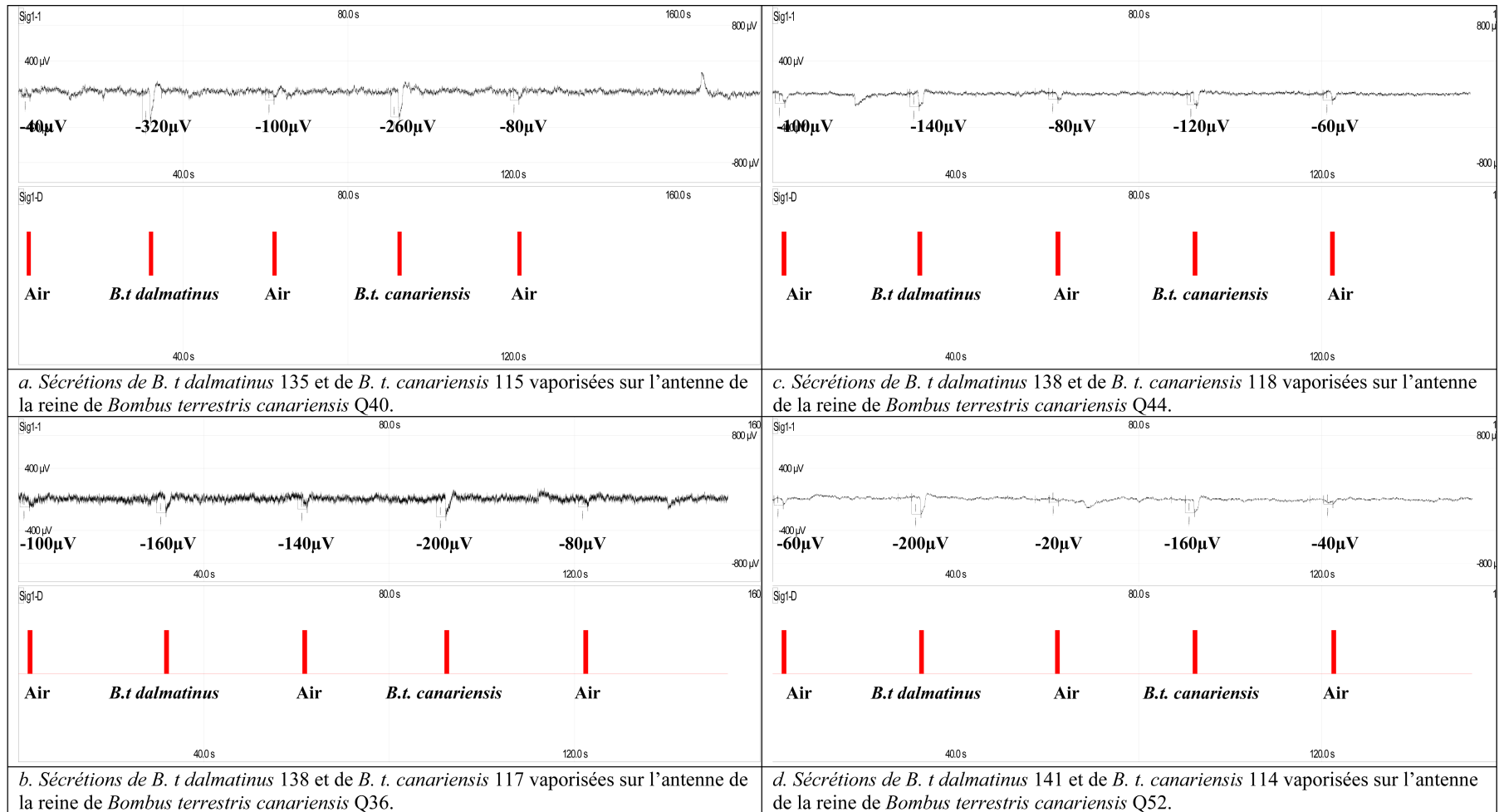


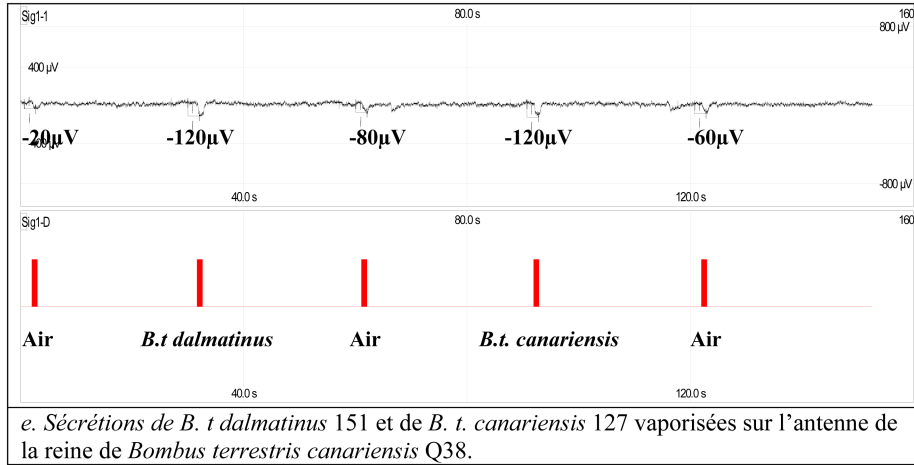
g. Sécrétions de *B. t. canariensis* 126 et de *B. t. dalmatinus* 140 vaporisées sur l'antenne de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q23.



f. Sécrétions de *B. t. canariensis* 126 et de *B. t. dalmatinus* 138 vaporisées sur l'antenne de la reine de *Bombus terrestris dalmatinus* Q49.

## 8.4. Electro-antennogrammes de l'antenne des reines de *Bombus terrestris canariensis*





e. Sécrétions de *B. t dalmatinus* 151 et de *B. t. canariensis* 127 vaporisées sur l'antenne de la reine de *Bombus terrestris canariensis* Q38.

