



**Faculté des Sciences**

**Laboratoire de Zoologie**

**Analyse des sécrétions des glandes labiales céphaliques  
des mâles de bourdons du sous-genre *Megabombus*  
(Hymenoptera, Apidae, *Bombus*)**

Directeur de mémoire  
Prof. P. Rasmont

Mémoire de fin d'étude présenté par  
**Arnaud Seché**  
En vue de l'obtention du diplôme de  
Licencié en Sciences Biologiques

Année académique 2004-2005

**Seché, A., 2005.** *Analyse des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de bourdons du sous-genre Megabombus (Hymenoptera, Apidae, Bombus).* Mémoire de fin d'Etudes, Laboratoire de Zoologie, Université de Mons-Hainaut, 33 pp.

**Résumé:** Les bourdons mâles attirent les femelles vierges conspécifiques à l'aide de phéromones sexuelles qu'ils déposent sur le substrat. Ces phéromones sont produites par deux grandes voies métaboliques: la voie des acides gras et la voie de l'acide mévalonique. Elles sont synthétisées dans leurs glandes labiales céphaliques qui sont des glandes acineuses paires. Les glandes sont situées derrière les yeux et leur contenu se déverse par un orifice à la base de la langue du bourdon.

Les phéromones sexuelles des bourdons sont spécifiques. L'étude de la composition de ces dernières est utile pour l'étude de la taxonomie des bourdons. En effet, l'étude de la morphologie seule ne permet pas de distinguer des taxons proches. Elle peut être améliorée par des analyses chimiques et éthologiques

Le sous-genre *Megabombus* est l'objet de ce travail. Sa classification présente encore beaucoup d'incertitudes en ce qui concerne le statut spécifique de plusieurs taxons. La composition de leurs glandes labiales céphaliques n'est pas encore connue, à l'exception des composés majeurs d'une seule espèce.

Nous avons trouvé 34 composés dans les sécrétions des *Megabombus* étudiés ici. Les sécrétions des bourdons de ce sous-genre sont caractérisées par une forte présence d'hydrocarbures qui ne sont généralement présents qu'à l'état de traces chez les autres sous-genres. Le composé principal chez 5 des 6 taxons étudiés est le nonadécène. Sa proportion n'est jamais inférieure à 38%. Il n'avait été découvert que chez une autre espèce de bourdon, et ce, à l'état de trace (<1%). Il semblerait donc que la présence de nonadécène en temps que composé majeur soit caractéristique du sous-genre de bourdons *Megabombus*. Les analyses statistiques multivariées séparent les différentes espèces. Cela confirme bien la spécificité des phéromones. Les méthodes de groupement permettent de faire deux groupes d'espèces: le premier formé de *B. ruderatus* et de *B. argillaceus*, le deuxième formé de *B. gerstaeckeri* et de *B. hortorum*.

**Mots clés:** *Bombus*, *Megabombus*, *B. ruderatus*, *B. argillaceus*, *B. gerstaeckeri*, *B. hortorum*, phéromone, glandes labiales céphaliques, chimiosystématique.

## Remerciements

Il est particulièrement agréable de remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce mémoire.

Je remercie particulièrement le Professeur P. Rasmont pour m'avoir accueilli dans son service, ainsi que pour son aide, ses critiques et conseils constructifs.

J'adresse un remerciement tout particulier au Dr. M. Terzo sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Qu'il soit remercié pour toute son attention et le partage de ses connaissances.

Je remercie également le Professeur P. Grosjean pour son aide précieuse dans l'élaboration et la compréhension des statistiques.

Je remercie le Professeur I. Valterova (Prague) qui a identifié les composés chimiques des sécrétions étudiées ici.

Je tiens à remercier le Professeur A. M. Aytekin qui a organisé la collecte du matériel de Turquie en 2003.

Je ne saurais oublier l'Ir D. Michez, Mlle S. Iserbyt et Mlle O. Ponchau pour leur disponibilité, leur patience et leurs précieux conseils.

Je remercie de même F. Delmarquette pour son aide technique.

Je remercie mes compagnons B. Namur, A. Secret et A. Coppée pour leur soutien et leur bonne humeur, ainsi que tous les étudiants de ma promotion.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ne sont pas citées ici, et qui, par leurs gestes les plus simples, ont contribué à la réalisation de ce travail.

## Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1. Généralités.....	1
1.2. Les phéromones sexuelles des bourdons .....	1
1.3. Chimiosystématique .....	2
1.4. Le sous-genre <i>Megabombus</i> Dalla Torre .....	3
<i>Bombus argillaceus</i> (Scopoli, 1763).....	3
<i>Bombus ruderatus</i> (Fabricius, 1775).....	4
<i>Bombus hortorum</i> (L., 1761) .....	4
<i>Bombus reinigiellus</i> (Rasmont, 1983).....	5
<i>Bombus portschinsky</i> Radoszkowski, 1883 .....	5
<i>Bombus saltuarius</i> (Skorikov, 1931).....	5
<i>Bombus consobrinus</i> Dalhobom, 1832.....	5
<i>Bombus gerstaeckeri</i> Morawitz, 1882 .....	6
1.5. Les phéromones des <i>Megabombus</i> .....	6
2. Objectifs .....	7
3. Matériel et méthode .....	8
3.1. Origine des données .....	8
3.2. Analyse des données .....	10
3.2.1. Analyse des phéromones .....	10
3.2.2. Analyses statistiques .....	10
3.2.2.1. Construction de la matrice.....	11
3.2.2.2. Analyse en Composantes Principales .....	13
3.2.2.2.1. Extraction des variables pertinentes par la méthode d'Escoufier.....	13
3.2.2.2.2. Analyse en Composantes Principales .....	13
3.2.2.3. Analyse Linéaire Discriminante.....	13
3.2.2.4. La méthode Indval.....	13
4. Résultats.....	14
4.1. Analyse des phéromones .....	14
4.2. Analyses statistiques.....	15
4.2.1. Analyse en Composantes Principales .....	15
4.2.2. Analyse en Composantes Principales avec la méthode d'Escoufier .....	16
4.2.3. Analyse Linéaire Discriminante.....	18
4.2.4. Groupements .....	19

5. Discussion.....	21
5.1. Composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques.....	21
5.2. Statut spécifique des taxons .....	23
5.2.1. Groupes d'espèces .....	23
5.2.2. Le cas de <i>Bombus argillaceus</i> .....	24
5.2.3. Le cas de <i>Bombus ruderatus</i> .....	24
5.2.4. Le cas de <i>Bombus hortorum</i> .....	25
5.2.5. Le cas de <i>Bombus gerstaeckeri</i> .....	26
6. Conclusions .....	27
6.1. Composition des sécrétions .....	27
6.2. Statuts spécifiques.....	28
6.3. Groupes d'espèces .....	28
6.4. Composition caractéristique des <i>Megabombus</i> .....	28
7. Bibliographie.....	29
8. Annexe: Scripts du logiciel R.....	32
8.1. Analyse en Composantes Principales .....	32
8.2. Analyse Linéaire Discriminante.....	33

# 1. Introduction

## 1.1. Généralités

Les bourdons sont des insectes sociaux organisés en colonies, avec différentes castes: femelles, mâles et ouvrières. L'accouplement se passe en fin de saison, juste avant que la colonie ne dépérisse.

Auparavant, la systématique des bourdons était purement typologique (Rasmont, 1988; Rasmont & Terzo, en préparation). A l'heure actuelle, leur systématique doit tenir compte des caractéristiques biologiques, chimiques mais aussi de la phénologie, de la taille des colonies et du comportement pré-copulatoire des mâles (Svensson, 1980) qui sont autant de facteurs d'isolement spécifique.

Parmi ces facteurs d'isolation spécifique, les phéromones sexuelles évitent l'hybridation entre espèces sympatriques ou parapatriques (Bergman, 1997).

## 1.2. Les phéromones sexuelles des bourdons

Lors de la période d'accouplement, les mâles de bourdons sécrètent des phéromones sexuelles pour marquer un territoire et ainsi y attirer les femelles vierges conspécifiques (Bergman, 1997).

Ces phéromones sexuelles sont produites dans la partie céphalique des glandes labiales (Fig. 1) (Kullenberg *et al.*, 1970, 1973; Bergstöm *et al.*, 1973; Ågren *et al.*, 1979; Bergström, 1980) et sont synthétisées selon deux grandes voies métaboliques:

- les dérivés des acides gras sont caractérisés par des hydrocarbures simples, constitués d'une longue chaîne aliphatique à fonction terminale alcool, acide, aldéhyde, ou méthyl ou éthyl esters d'acides gras;
- les terpénoïdes (issus de la voie de l'acide mévalonique) sont des molécules dont les composés de bases sont des isoprènes. On retrouve ainsi des mono-, des sesqui- et des diterpènes acycliques à fonctions terminales oxygénées.

Les mâles déposent ces sécrétions sur un substrat par machouillage (Haas, 1952; Awram, 1970 cités par Ågren *et al.*, 1979; Kullenberg *et al.*, 1973; Svensson, observations non publiées, citées par Ågren *et al.*, 1979). Celles-ci s'écoulent par un orifice situé à la base de leur langue. Ces phéromones sexuelles sont spécifiques (Calam, 1969; Bergström, 1981).

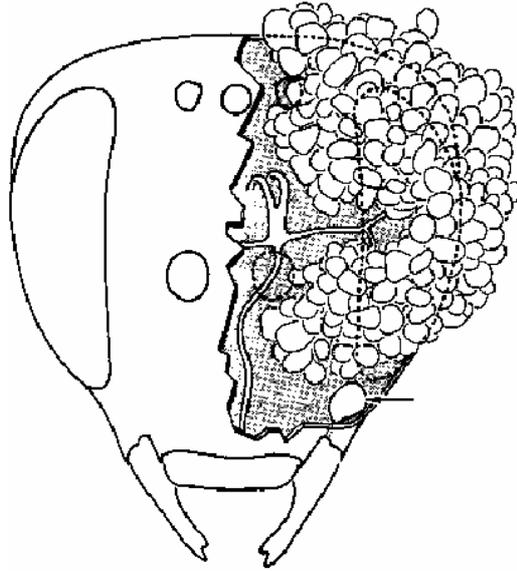


Figure 1. Position de la glande labiale céphalique gauche d'un bourdon mâle.

L'analyse de la composition des sécrétions labiales céphaliques est donc quelque chose de très important pour l'étude de la taxonomie des bourdons. Elle fournit énormément de renseignements. Par exemple, elle permet de valider le statut spécifique ou infraspécifique de certains taxons de statut douteux.

Néanmoins, une variabilité de la composition des phéromones sexuelles chez une même espèce peut être rencontrée en fonction de l'âge du spécimen (Ågren *et al.*, 1979), entre populations ou entre spécimens (Terzo, 2003).

### 1.3. Chimiosystématique

Les caractéristiques morphologiques, écologiques, éthologiques et temporelles interviennent dans les mécanismes d'isolation des espèces. Toutes doivent être prises en compte pour caractériser les espèces, ainsi que leurs relations. La caractéristique éthologique est la plus efficace (Svensson, 1980).

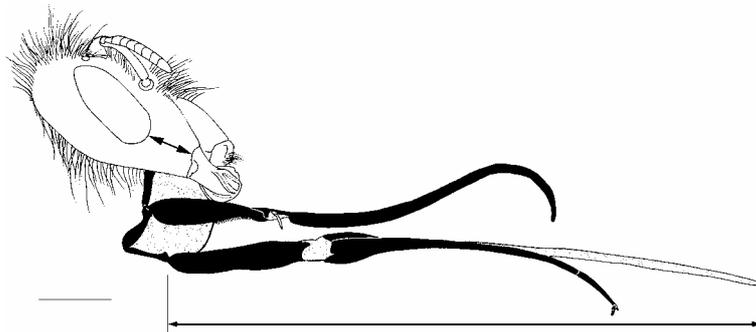
En ne considérant que les caractères morphologiques, il est parfois très difficile de distinguer des espèces proches. L'étude des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de bourdons a ainsi pu démontrer l'existence d'espèces jumelles jusque là regroupées en une seule espèce. Par exemple, en étudiant les phéromones sexuelles de *Bombus (Pyrobombus) lapponicus* (Fabricius), Svensson (1980) remarque deux compositions phéromonales totalement différentes. Cette étude a permis de distinguer deux espèces différentes: *Bombus (Pyrobombus) lapponicus* et *Bombus (Pyrobombus) monticola* Smith.

Ainsi, la prise en compte de caractères écologiques, éthologiques ou physiologiques permet actuellement de mieux définir le concept d'espèce.

Certains sous-genres de bourdons présentent une composition caractéristique des sécrétions labiales céphaliques. Il y a aussi une caractérisation spécifique (Bergström, 1980). Cela évite l'hybridation interspécifique. En effet, lorsque différentes espèces cohabitent dans un même environnement, il y a de fortes différences au niveau de la composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques, mais aussi au niveau de la forme des génitalia et de la période d'accouplement. Ces différences permettent de minimiser les risques de copulation entre individus d'espèces différentes (Bergström *et al.*, 1981).

#### 1.4. Le sous-genre *Megabombus* Dalla Torre

Le sous-genre *Megabombus* Dalla Torre est caractérisé par la présence d'espaces malaires très longs et d'une langue extrêmement longue, ce qui lui permet de butiner les fleurs avec de très longues corolles (Fig. 2).



**Figure 2.** Tête de profil de *Bombus gerstaeckeri* Morawitz. (Dessin de M. Terzo). Les doubles flèches indiquent la mesure de l'espace malar et l'extension du proboscis.

Voici les différentes espèces ouest-paléarctique que l'on trouve dans le sous-genre *Megabombus*:

##### ***Bombus argillaceus* (Scopoli, 1763)**

C'est une espèce abondante en Méditerranée orientale, mais que l'on trouve aussi vers l'ouest jusque dans le sud-est de la France. Dans le sud-est de la France, on l'observe dans l'intervalle d'altitudes 350-1800m avec 80% des observations dans l'intervalle 850-1415m (Rasmont, 1988). En Turquie, Rasmont & Flagothier (1996) donnent comme intervalle 400-2855m avec 90% des observations dans 900-1870m (Rasmont & Terzo, en préparation).

*Bombus argillaceus* est une espèce des milieux ouverts.

Il s'agit de l'espèce sœur de *Bombus ruderatus* (Fabricius).

### ***Bombus ruderatus* (Fabricius, 1775)**

C'est une espèce courante en Europe occidentale et particulièrement dans sa zone méditerranéenne.

C'est résolument une espèce de basse altitude. Son abondance décroît lorsqu'on quitte les plaines. Dans le Languedoc-Roussillon, Rasmont (1988) indique un intervalle d'altitude 8-1159m avec 80% des effectifs dans 59-520m (Rasmont & Terzo, en préparation).

Cette espèce est considérée par la plupart des auteurs comme une espèce de milieux ouverts.

On peut distinguer plusieurs sous-espèces de *Bombus ruderatus*:

*B. ruderatus ruderatus* (Fabricius, 1775)

*B. ruderatus autumnalis* (Fabricius, 1793)

*B. ruderatus atrocorticulatus* Vogt, 1909

*B. ruderatus siculus* Friese, 1909

*B. ruderatus perniger* (Harris, 1780)

*B. ruderatus corsicola* Strand, 1917

*B. ruderatus sardiniensis* Tournier, 1890

Dans le sud-est de la France, là où *B. ruderatus* est sympatrique de *B. argillaceus*, les deux espèces semblent s'exclure. La première reste à basse altitude (sous 500m), alors que la seconde préfère les altitudes supérieures.

### ***Bombus hortorum* (L., 1761)**

C'est une espèce très abondante dans une large part de la région ouest-paléarctique depuis les rives de la Méditerranée jusqu'à celles de la Mer de Barents. Elle est plus précoce que les deux précédentes. En effet, on l'observe en Belgique dès la deuxième semaine du mois de mars (Rasmont & Terzo, en préparation).

Elle supporte une large amplitude climatique.

Pittioni & Schmidt (1942), Dylewska (1958) et Rasmont (1988) la considèrent comme une espèce de lisière ou eurytope.

On peut distinguer plusieurs sous-espèces de *Bombus hortorum*:

*B. hortorum hortorum* (L., 1761)

*B. hortorum asturiensis* (Tkalcu, 1974)

*B. hortorum ivernicus* Sladen, 1912

*B. hortorum kussariensis* Pittioni, 1937

*B. hortorum jonghei* Rasmont & Adamski, 1996

### ***Bombus reinigiellus* (Rasmont, 1983)**

Cette espèce n'existe que dans la Sierra Nevada. Elle y est rare. Il s'agit du bourdon ouest-paléarctique dont la distribution est la plus restreinte.

C'est une espèce de haute altitude, on ne l'a observée qu'entre 1900 et 2920m d'altitude (Rasmont & Terzo, en préparation).

Elle vit dans les terrains ouverts.

### ***Bombus portschinsky* Radoszkowski, 1883**

C'est une espèce du nord-est de l'Anatolie, du Caucase, d'Arménie et du nord de l'Iran. Elle vit en haute altitude, selon Rasmont & Flagothier (1996), de 1400 à 3500m, avec 80% des spécimens dans l'intervalle 1800-2750 (Rasmont & Terzo, en préparation)

Elle est assez eurytope: on peut la trouver dans des forêts claires, les steppes boisées et les steppes des étages subalpins et alpins.

### ***Bombus saltuarius* (Skorikov, 1931)**

La distribution de cette espèce est restreinte à l'extrême nord de la Russie.

Nous n'avons aucune donnée sur l'altitude.

C'est une espèce de la taïga et de la toundra.

### ***Bombus consobrinus* Dalhöm, 1832**

C'est une espèce typique de la taïga nordique, de la Scandinavie au Japon, et sa principale plante nourricière, *Aconitum septentrionale* Koelle, lui est indispensable (Löken, 1973).

Comme altitude, Löken (1973) donne de 0 à 1300m pour le sud de la Norvège (Rasmont & Terzo, en préparation).

Le statut spécifique de *B. consobrinus* et *B. gerstaeckeri* est disputé. Les auteurs en faveur de la séparation spécifique de ces deux taxons sont les plus nombreux (Krüger, 1920; Pittioni, 1938, 1939; Tkalcu, 1969; Löken, 1973; Reinig, 1983; Rasmont, 1988) que ceux en faveur d'une espèce unique (Kruseman, 1959; Reinig, 1965).

### ***Bombus gerstaeckeri* Morawitz, 1882**

C'est l'espèce de la région ouest-paléarctique qui présente les joues et les pièces buccales les plus longues.

On trouve *B. gerstaeckeri* dans les Alpes, les Pyrénées, les Carpates et le Caucase. Cette distribution est largement disjointe.

Comme altitude, pour 119 observations dans les Pyrénées, l'espèce a été observée de 1560 à 2180m, avec 80% des spécimens entre 1570 et 2000m.

Pour les Alpes, 33 observations: 1100-2700m avec 80% des observations entre 1300-2050m (Rasmont & Terzo, en préparation).

On retrouve cette espèce dans l'étage subalpin, dans les forêts clairsemées de conifères, là où elle trouve les plantes du genre *Aconitum*, qui sont sa source de nourriture unique.

## 1.5. Les phéromones des *Megabombus*

Appelgren (1991) a analysé les sécrétions des glandes labiales céphaliques de deux espèces de *Megabombus*, *B. hortorum* et *B. consobrinus*, ainsi que différentes espèces de deux autres sous-genres de bourdons, *Thoracobombus* Dalla Torre et *Subterraneobombus* Vogt (Tab. 1).

Nous pouvons observer que chaque sous-genre est caractérisé par une gamme cohérente de composés. Les espèces d'un même sous-genre ont des chromatogrammes ressemblants.

En ce qui concerne les *Megabombus*, leur composé principal serait un alcène: le nonadécène (Tab. 1). Ce composé n'a jamais été mis en évidence chez d'autres sous-genres de bourdons. Chez *B. hortorum*, on trouve également du géranylgeranial et du farnésol comme composés majeurs.

**Tableau 1. Abondance relative (%) des composants majeurs des sécrétions des glandes labiales céphaliques mâles chez différentes espèces de bourdons**

Poids moléculaires	Composés										
		<i>B. (M.) hortorum</i> (L.)	<i>B. (M.) consobrinus</i> Dahlbom	<i>B. (T.) pascorum</i> (Gmelin)	<i>B. (T.) humilis</i> Illiger	<i>B. (T.) muscorum</i> (L.)	<i>B. (T.) ruderarius</i> Müller	<i>B. (T.) sylvvarum</i> (L.)	<i>B. (T.) veteranus</i> (Fabricius)	<i>B. (S.) subterraneus</i> (L.)	<i>B. (S.) distinguendus</i> Morawitz
222	all- <i>trans</i> -farnesol	17									
288	Geranylgeranial	21	3								96
290	Geanylcitronellal									100	
290	Geranylinalool										4
238	Hexadecenal			40	4						
266	Octadecenal				32						
294	Icosenal				3						
240	Hexadecenol			60	44	48	88	29	65		
268	Octadecenol	7	1		8		12	2	15		
296	Icosenol				6						
282	Hexadecenyl acetate				3			69	15		
310	Octadecenyl acetate					52			5		
266	Nonadecene	55	96								

## 2. Objectifs

Par cette étude, on se pose les questions suivantes:

- Quels sont les composés majeurs des phéromones sexuelles chez les mâles de bourdons d'Europe occidentale du sous-genre *Megabombus* ?
- Les sécrétions étudiées permettent-elles de valider leur statut spécifique ?
- Quelles espèces sont phénétiquement plus proches sur base de leurs sécrétions ?
- La composition de ces sécrétions présente-elle des caractéristiques communes aux *Megabombus* ?

### 3. Matériel et méthode

#### 3.1. Origine des données

72 *Megabombus* mâles de 5 espèces ont été capturés par le laboratoire de zoologie de Mons.

Seules 4 espèces ont été étudiées ici.

12 mâles de *B. argillaceus* (arg # # #) et 11 mâles de *B. hortorum kussariensis* (kus # # #) ont été capturés par M. Aytekin, Y. Barbier, H. Hines, P. Rasmont et M. Terzo pendant l'été 2002, en Turquie, aux endroits suivants (coordonnées WGS84):

Aksaray: Ağzıkarahan, 38°27'26''N 34°09'26''E 1200m 2.VIII.2002 (arg513); à l'est de Nevşehir: entre Ürgüp et Aksalur, 38°38'24''N 34°58'15''E 1400m 2.VII.2002 (arg518); Kayseri: Erciyes dağı, 38°28'36''N 35°30'06''E 2000m 3.VIII.2002 (arg 523); Kayseri: à l'ouest de Çardýk Tepes, 38°33'43''N 35°38'27''E 1900m 4.VIII.2002 (arg549, arg558); Makistmor: 39°57'04''N 38°37'52''E 1510m 5.VIII.2002 (arg559, arg596); Kars: 5km au sud de Çamlıçtak, 41°04'31''N 42°49'37''E 1960m 9.VIII.2002 (arg721, arg722); Kars: Bogazkoy, 40°42'36''N 43°08'30''E 1690m 9.VIII.2002 (arg735, arg736, arg737); Rize: Aydu, Kaçkar dağı Milliparkı 40°56'01''N 41°08'26''E 1600m 6.VIII.2002 (hus594, kys628, kus627, kus629, kus630, kus632, kus633, kus634, kus635); Rize: Aydu, Kaçkar dağı Milliparkı 40°55'07''N 41°08'42''E 1790m 6.VIII.2002 (kus603, kus604).

9 mâles de *B. gerstaeckeri* (ger # # #) et 9 mâles de *B. hortorum hortorum* (hort # # #) ont été capturés par S. Iserbyt, O. Ponchau, P. Rasmont et M. Terzo pendant l'été 2001, en France, aux endroits suivants (coordonnées WGS84):

Pyrénées-Orientales (PO): Err, Fonts de la Devesa 42°26'00''E 2°24'36''E 1388m 16.VII.2001 (hort036); PO: Egat, Forêt d'Egat 42°30'38''N 2°01'17''E 1800m 29.VII.2001 (hort276, ger259, ger288, ger279, ger293); PO: Via, La Balladosa 42°28'48''N 02°02'25''E 1520m 7.VII.2001 (hort154, hort155); 48: Les Salces, Bonnecombe 44°35'06''N 3°06'34''E 1310m 1.IX.2001 (hort349); PO: Saillagouse, Camp del Sola 42°27'54''N 02°00'56''E 1324m 17.VII.2001 (hort057); PO: Eyne, Jasse d'en Calvet 42°27'21''N 2°06'09''E 1848m 28.VIII.2001 (ger256, ger227); PO: Eyne, Els Fontenals 2060m 30.VIII.2001 (hort300, ger307, ger314); PO: Eyne, Serrat de Front Freda 42°28'09''N 2°06'29''E 2050m 30.VIII.2001 (ger309).  
Hérault: Romiguières, 43°48'49''N 3°14'44''E 780m 1.IX.2001 (hort340).  
PO: Eyne, Eyne 2600, UTM: 31TDH2602 1850m 13.VIII.2001 (hort001).

18 mâles de *B. ruderatus ruderatus* (rut # # #) et 4 mâles de *B. ruderatus autumnalis* (aut # # #) ont été capturés par A. Coppée, D. Michez, B. Namur, M. Podrecca, P. Rasmont et moi-même pendant l'été 2004, en France, aux endroits suivants (coordonnées WGS84):

PO: Ille-sur-Têt 42°40'40''N 2°38'01''E 136m 17.VII.2004 (rud010, rud011, rud013, rud015, rud017, rud019, rud021); PO: Corbère 42°39'35''N 2°40'10''E 150m 17.VII.2004 (aut023); PO: Corbère les Cabanes 42°39'39''N 2°40'40''E 147m 17.VIII.2004 (rud025); PO: Corbère les Cabanes 42°39'39''N 2°40'39''E 150m 18.VII.2004 (rud026); PO: Millas 42°42'47''N 2°42'21''E 102m 23.VII.2004 (rud027); PO: Ille sur Têt 42°40'40''N 2°38'01''E 136m 23.VII.2004 (rud028, rud029, rud030, rud031, rud033, rud034); PO: Ille sur Têt 42°39'39''N 2°40'40''E 146m 23.VII.2004 (rud035, rud039).

Var: Gonfaron, Notre Dame du Figuier 43°18'27''N 6°18'33''E 240m 20.VII.2004 (aut037); Var: Gonfaron, Notre Dame du Figuier 43°18'28''N 6°18'33''E 240m 21.VII.2004 (rud042, rud043).

Les 63 bourdons mâles sont capturés au filet et à l'aspirateur. Ils sont ensuite sacrifiés par un court séjour au congélateur. La dissection de leurs glandes labiales est effectuée comme suit:

- la capsule céphalique est disséquée, la cuticule qui recouvre les yeux est enlevée (Fig. 3);
- les glandes labiales sont prélevées et placées dans un flacon qui contient 200µl d'hexane;
- les flacons sont laissés 24h à température ambiante, puis conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.



Figure 3. Glande labiale céphalique de mâle de bourdon mise à nu.

## 3.2. Analyse des données

### 3.2.1. Analyse des phéromones

L'analyse de la composition des phéromones se fait grâce à un GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectroscopy), c'est-à-dire par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse.

Le MS est de type "ion trap" de marque Finnigan GCQ.

La colonne utilisée a les spécificités suivantes: WCOT Fused Silica column type; CP-Wax 52 CB stationary phase; colonne longue de 30m; diamètre intérieur de 0.32mm; film d'une épaisseur de 0.25 $\mu$ m.

La température d'injection est de 250°C. La température initiale de la colonne est maintenue à 150°C durant 5 minutes, puis augmente jusque 225°C à raison de 5°C/min et se maintient à 225°C pendant 5 minutes.

Le gaz utilisé dans la colonne est de l'hélium qui s'écoule à 50cm/sec. Le mode d'injection est de type "splitless".

A chaque analyse, 1  $\mu$ l d'échantillon est analysé.

Les différents composés des sécrétions labiales céphaliques sont identifiés par le Dr I. Valterova (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, The Czech Republic) à l'aide d'un GC-MS.

### 3.2.2. Analyses statistiques

Les logiciels R (R Development Core Team, 2004.) et NTSYS-pc Version 1.8 (Rohlf, 1993) ont été utilisés pour le traitement statistique des données.

**1. Le logiciel NTSYS** est utilisé pour représenter graphiquement, sous forme d'un dendrogramme, les groupes d'espèces au départ d'une matrice de corrélation de Phi. La méthode de groupement choisie est un consensus strict sur base des dendrogrammes issues du lien.

**2. Le logiciel R** est utilisé pour réaliser les analyses multivariées telles que l'Analyse en Composantes Principales et l'Analyse Linéaire Discriminante.

### 3.2.2.1. Construction de la matrice

Les sécrétions des glandes labiales céphaliques analysées à l'UMH fournissent un chromatogramme pour chaque échantillon (Fig. 4). A l'aide du logiciel Xcalibur, nous réalisons une intégration des pics du chromatogramme (Fig. 5).

Une matrice spécimens\*composés est réalisée. Les valeurs figurées sont les surfaces des pics mesurées par le logiciel Xcalibur (Tab. 2).

Ces surfaces absolues sont alors transformées en surfaces relatives pour chaque spécimen (Tab. 3).

Cette matrice sert de base aux tests statistiques.

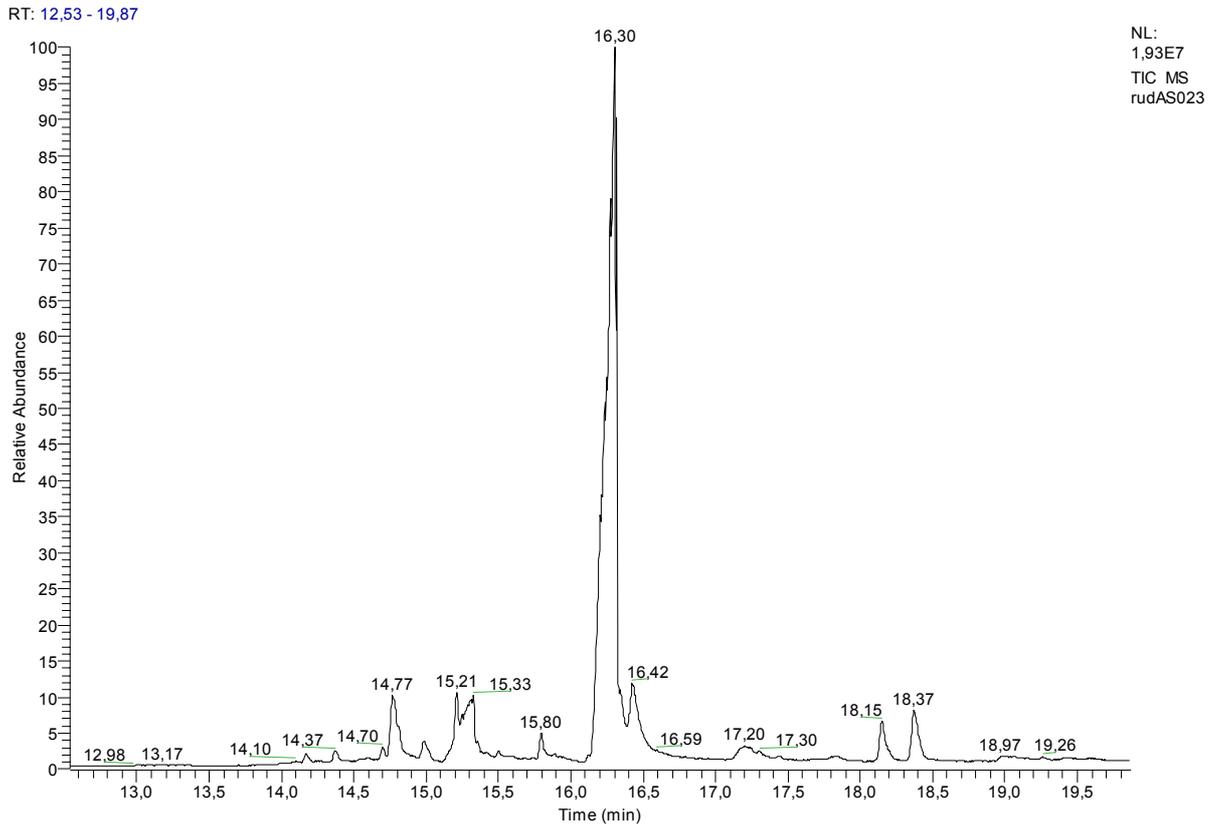


Figure 4. Chromatogramme de *B. ruderatus autumnalis*.

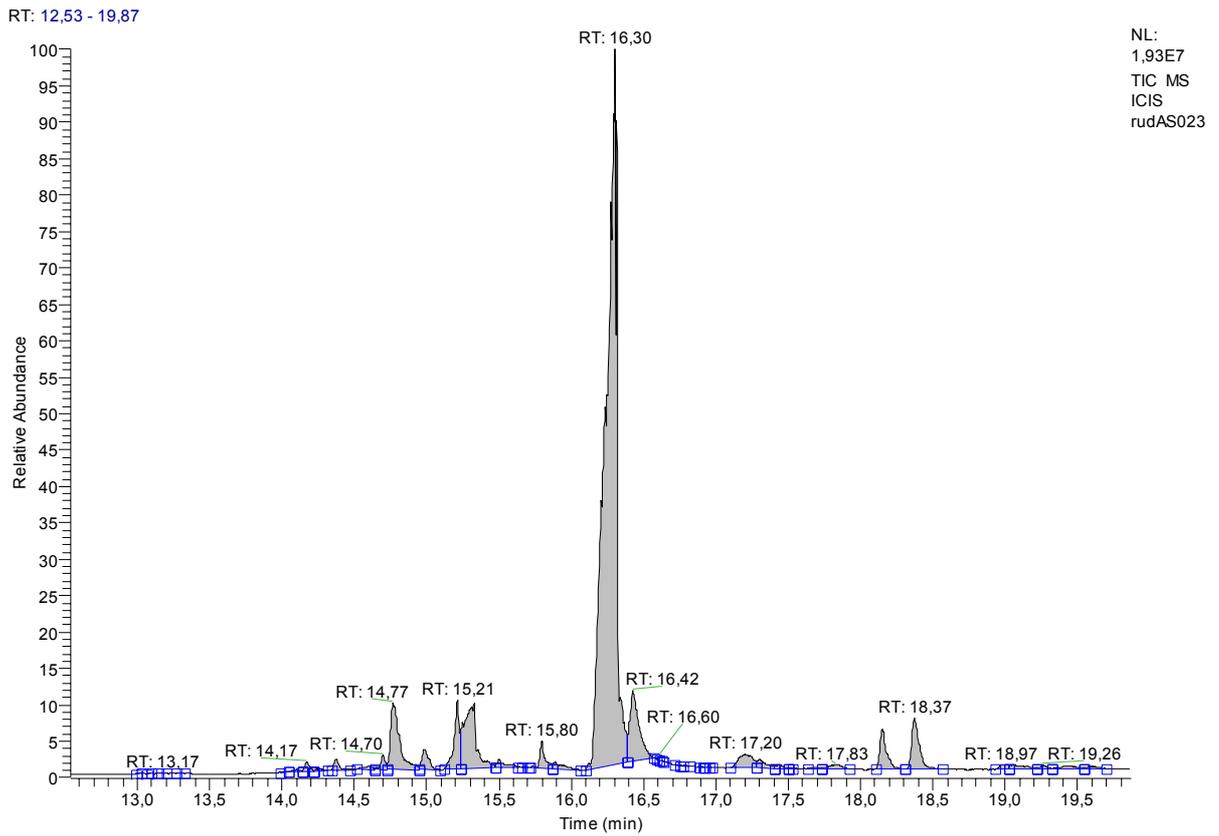


Figure 5. Chromatogramme après intégration des pics.

**Tableau 2. Exemple de tableau obtenu après avoir placé les valeurs absolues des surfaces de chaque composé pour chaque spécimen**

	Spécimen 1	Spécimen 2	Spécimen 3	Spécimen X
Composé 1	21203,227	31851,265	15832,236	...
Composé 2	1235,128	807,263	1523,236	...
Composé 3	659632,236	897542,223	963251,121	...
Composé X	...	...	...	...

**Tableau 3. Exemple de tableau obtenu après avoir calculé les surfaces relatives (%) pour chaque spécimen**

	Spécimen 1	Spécimen 2	Spécimen 3	Spécimen X
Composé 1	0,106	1,152	2,236	...
Composé 2	0,061	0,123	0,025	...
Composé 3	32,981	26,845	45,265	...
Composé X	...	...	...	...

### 3.2.2.2. Analyse en Composantes Principales

#### 3.2.2.2.1. Extraction des variables pertinentes par la méthode d'Escoufier

La méthode des vecteurs équivalents d'Escoufier (1970) a pour but de réduire le nombre de variables en identifiant les variables corrélées entre elles, de telle sorte que la variance exprimée par ces variables soit la plus proche possible de la variance exprimée par le jeu de données initial. On obtient un classement des variables dans l'ordre décroissant de la variance totale expliquée.

Cette opération est réalisée avec le logiciel R (R Development Core Team, 2004.)

#### 3.2.2.2.2. Analyse en Composantes Principales

Une analyse en composantes principales est réalisée afin de savoir si l'on peut différencier les populations sur base de leurs phéromones. Cette analyse permet la mise en évidence des facteurs les plus explicatifs du jeu de données.

### 3.2.2.3. Analyse Linéaire Discriminante

Une analyse linéaire discriminante va chercher les descripteurs les plus pertinents qui permettent de distinguer les groupes qui composent le jeu de données.

### 3.2.2.4. La méthode Indval

Cette méthode permet de mettre en évidence les composés indicateurs ou caractéristiques d'un groupe de spécimens des 6 taxons étudiés. La méthode tient compte de la proportion moyenne de chaque composé dans un groupe de spécimens ( $A_{ij}$ ) et de la fréquence relative des composés dans ce groupe de spécimens ( $B_{ij}$ ). Cet indice peut s'apparenter à un indice de spécificité d'un composé pour un groupe de spécimens donné. L'indice IndVal (Dufrêne & Legendre, 1997) se calcule de la manière suivante:

$$\text{IndVal} = A_{ij} * B_{ij} * 100$$

Avec:  $A_{ij}$ :  $\sum_{ij} / \sum_i$ .

$B_{ij}$ :  $\text{Occ}_{ij} / [\text{Occ}_j]$

## 4. Résultats

### 4.1. Analyse des phéromones

34 composés ont été trouvés dans les sécrétions labiales céphaliques des 6 taxons de *Megabombus* pris en compte pour cette étude (Tab. 4 et 5).

**Tableau 4. Proportion relative (%) de l'ensemble des composés des glandes labiales céphaliques chez les mâles de *Megabombus***

Temps de rétention	Composés	<i>B. r. rruderatus</i>	<i>B. r. autumnalis</i>	<i>B. argillaceus</i>	<i>B. gerstaeckeri</i>	<i>B. h. hortorum</i>	<i>B. h. kussariensis</i>
14:11	heptadecene	0,24	0,26	0,09	0,00	0,02	0,08
14:31	heptadecane	4,11	0,38	0,16	0,00	0,04	0,22
14:64	farnesal 1	0,20	0,28	0,00	0,38	0,25	2,38
14:71	farnesol	2,65	3,63	0,00	0,00	16,55	2,17
14:93	farnesal 2	0,69	0,73	0,00	0,00	2,05	13,08
15:12	octadecene	3,88	2,14	1,89	0,63	0,24	0,76
15:29	octadecane	0,22	0,29	0,28	0,18	0,00	0,03
15:29	tetradecenoic acide + ethyltetradecenate	4,19	5,54	5,37	0,00	0,00	0,00
15:63	hexadecenol?	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42
16:21	nonadecene	57,62	63,81	68,81	38,73	49,97	52,10
16:35	nonadecane	5,11	4,03	3,65	1,98	5,02	7,40
17:11	icosene	1,78	2,37	0,62	0,00	0,05	0,13
17:36	icosane	0,27	0,29	0,09	0,00	0,04	1,36
18:08	hencosene	2,99	3,01	1,54	0,09	0,25	0,20
18:29	hencosane	5,71	4,81	3,60	1,74	5,45	4,87
18:63	octadecenol	0,00	0,00	0,00	0,13	2,93	2,28
18:92	docos-9-ene	0,70	0,75	0,47	0,00	0,00	0,18
18:98	docos-7-ene	0,94	0,41	0,09	0,00	0,00	0,00
19:18	docosane	0,62	0,43	0,27	0,00	0,00	0,00
19:27	geranylgeranial 1	0,00	0,00	0,00	0,00	4,32	2,83
19:35	geranylcitronellol	0,00	0,00	0,00	13,08	0,00	0,00
19:57	geranylgeranial 2	0,00	0,00	0,00	41,90	13,77	8,43
19:81	tricosene	0,31	0,28	0,43	0,00	0,13	0,08
20:03	tricosane	5,41	5,11	6,74	1,08	1,24	0,93
21:46	pentacosene	0,31	0,36	3,49	0,00	0,06	0,02
21:64	pentacosane	0,53	0,33	0,91	0,09	0,03	0,03
22:23	hexacosene	0,05	0,04	0,09	0,00	0,00	0,00
22:38	hexacosane	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:89	hexadecenoic acide	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
22:96	heptacosene	0,55	0,32	0,88	0,00	0,00	0,00
23:11	heptacosane	0,28	0,10	0,19	0,00	0,00	0,00
24:34	nonacos-9-ene	0,20	0,06	0,14	0,00	0,00	0,00
24:51	nonacosane	0,21	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
25:20	hentiacont-9-ene	0,22	0,24	0,07	0,00	0,00	0,00

**Tableau 5. Ensemble des composés des glandes labiales céphaliques chez différents taxons de *Megabombus***

Taxons	heptadecene	heptadecane	Farnesal 1	farnesol	Farnesal 2	octadecene	octadecane	tetradecenoicacide ethyltetradecenate	nonadecene	nonadecane	icosene	icosane	hénicosene	hénicosane	docos-9-ene	docos-7-ene	docosane
<i>B. r. ruderatus</i>	**	**	*	**	*	**	*	**	**	**	**	*	**	**	*	*	*
<i>B. r. autumnalis</i>	*	*	*	**	*	**	*	**	**	**	**	*	**	**	*	*	*
<i>B. argillaceus</i>	*	*	-	-	-	**	*	**	**	**	*	*	**	**	*	*	*
<i>B. gerstaeckeri</i>	-	-	*	-	-	*	*	-	**	**	-	-	*	**	-	-	-
<i>B. h. hortorum</i>	*	*	*	**	**	*	-	-	**	**	*	*	*	**	-	-	-
<i>B. h. kussariensis</i>	*	*	**	**	**	*	*	-	**	**	*	**	*	**	*	-	-

(suite)	tricosene	tricosane	pentacosene	pentacosane	hexacosene	hexacosane	heptacosene	heptacosane	nonacos-9-ene	nonacosane	hentriacont-9-ene	Hexadecenoic acide	octadecenol	geranyl citronello	geranylgeranial 2	geranylgeranial 1	hexadecenol?
<i>B. r. ruderatus</i>	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
<i>B. r. autumnalis</i>	*	**	*	*	*	-	*	*	*	-	*	-	-	-	-	-	-
<i>B. argillaceus</i>	*	**	**	*	*	-	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
<i>B. gerstaeckeri</i>	-	**	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	*	**	**	-	-
<i>B. h. hortorum</i>	*	**	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	**	-	**	**	-
<i>B. h. kussariensis</i>	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	**	-	**	**	*

-: composé absent; \*: composé avec une surface relative <1%; \*\*: composé avec une surface relative >1%; en gris clair: composé présent chez tous les taxons; en gris foncé: composé uniquement présent chez une espèce

## 4.2. Analyses statistiques

### 4.2.1. Analyse en Composantes Principales

Les trois premières composantes expliquent 61,07% de la variance.

- la composante 1 explique 36,50%;
- la composante 2 explique 13,62%;
- la composante 3 explique 10,95%.

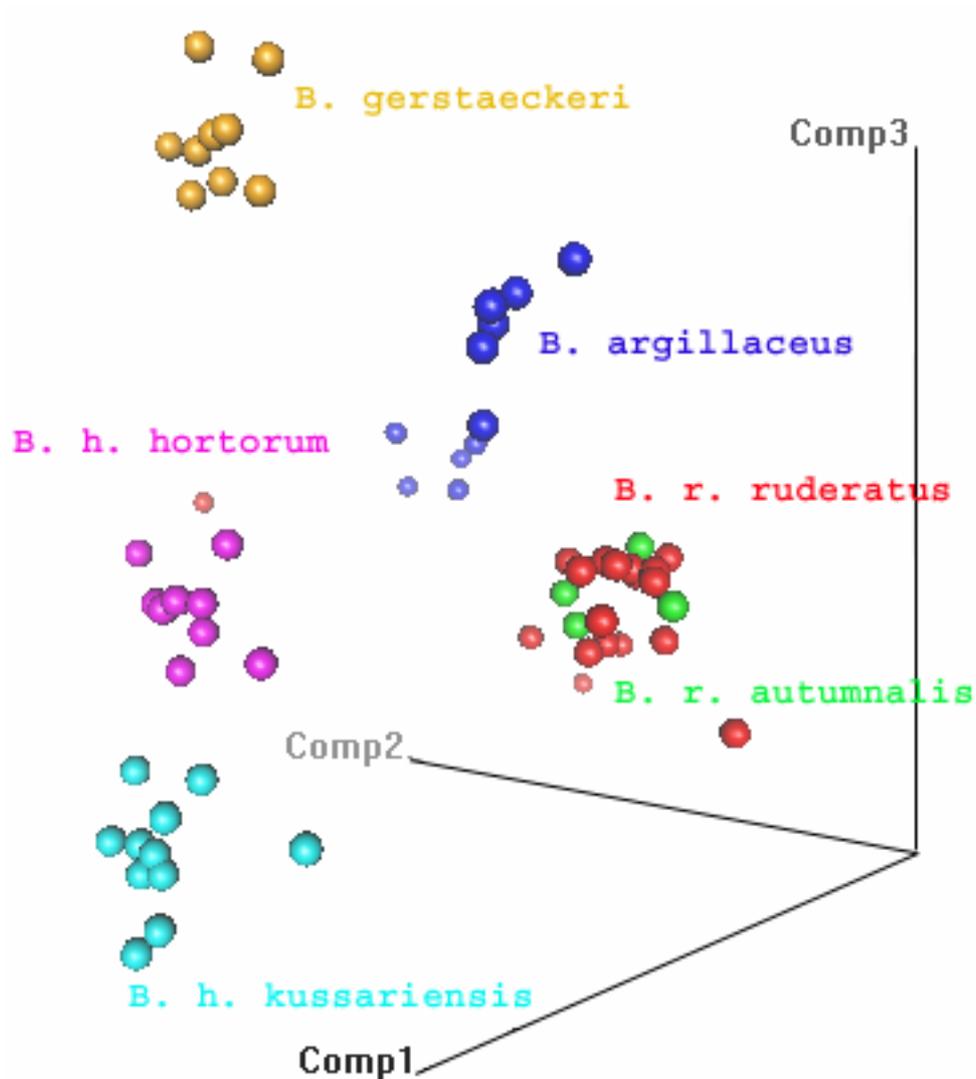


Figure 6. Analyse en Composantes Principales: position des individus par rapport aux 3 axes.

Les *B. ruderatus ruderatus* et le *B. ruderatus autumnalis* ne forment qu'un groupe, alors que les autres taxons forment des groupes distincts.

Les *B. argillaceus* sont séparés en 2 groupes (Fig. 6).

#### 4.2.2. Analyse en Composantes Principales avec la méthode d'Escoufier

La méthode d'Escoufier nous permet de diminuer le nombre de composés à considérer en conservant le maximum de variance du jeu de données de départ. Elle permet donc d'extraire des 34 variables de départ un échantillon de 10 variables avec les composantes principales de ces 10 variables aussi proches que possible de celles des 34 variables initiales.

Les 10 composés choisis sont:

- l'heptacosène;
- l'henicosène;
- le farnésal 2;
- le docosane;
- l'acide tetradécénoïque + éthyltetradénate;
- le pentacosane;
- le géranylcitronellol;
- l'octadécène;
- le tricosane;
- le farnésol.

Ces 10 composés permettent d'expliquer 95,3% de la variance du jeu de données de départ.

Sur base de cette matrice réduite 68 individus \* 10 composés, une ACP est réalisée. Les 3 premiers axes expliquent 78,88% de la variance avec une contribution respective de:

- le premier explique 48,98%;
- le deuxième explique 17,96%;
- le troisième explique 11,99%.

Les *B. ruderatus ruderatus* et les *B. ruderatus autumnalis* ne forment toujours qu'un seul groupe.

*B. hortorum hortorum* et *B. hortorum kussariensis* ne sont maintenant plus séparés, ils ne forment plus qu'un seul groupe. Cela est dû à l'utilisation de la méthode d'Escoufier (Fig. 7). Avec celle-ci, on ne prend plus en compte un ou plusieurs composés qui permettent la discrimination *B. h. kussariensis* / *B. h. hortorum*. La méthode d'Escoufier n'a pas retenu ce ou ces composés car ils expliquent peu de variance.

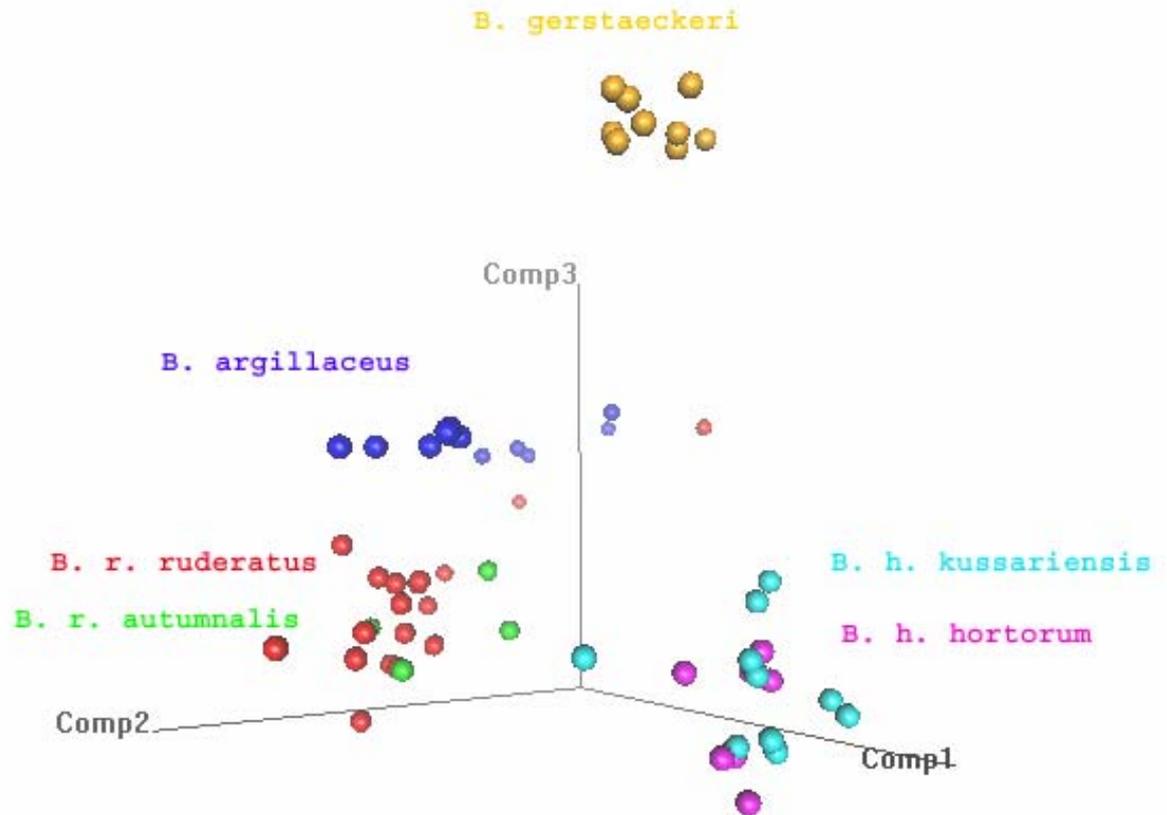


Figure 7. Analyse en Composantes Principales, méthode d'Escoufier: position des individus par rapport aux 3 axes.

#### 4.2.3. Analyse Linéaire Discriminante

L'analyse discriminante sépare 5 taxons. Seuls *B. ruderatus ruderatus* et *B. ruderatus autumnalis* restent groupés.

La prise en compte des 3 premiers axes explique 97,68% de la variance:

-l'axe 1 explique 73,74%;

-l'axe 2 explique 19,53%;

-l'axe 3 explique 4,41%.

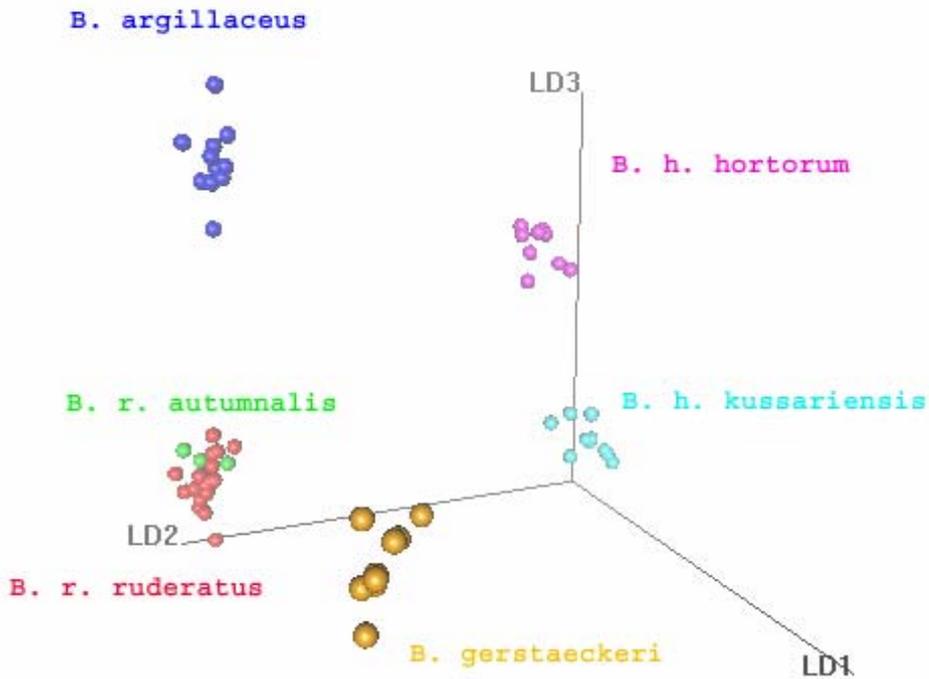


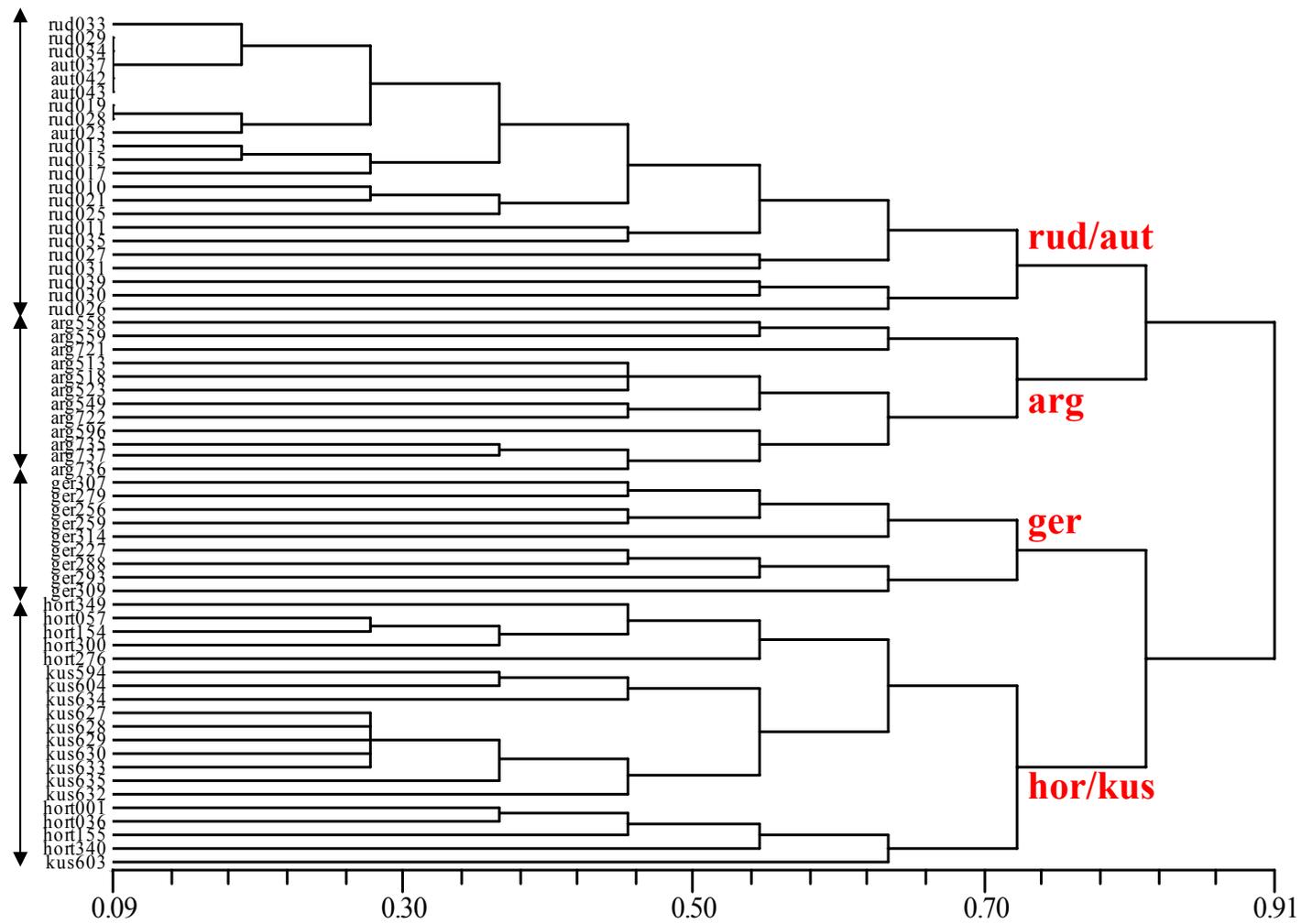
Figure 8. Analyse Linéaire Discriminante: position des individus par rapport aux 3 axes.

La distinction *B. ruderatus ruderatus*/*B. ruderatus autumnalis* semble difficile (Fig. 8).

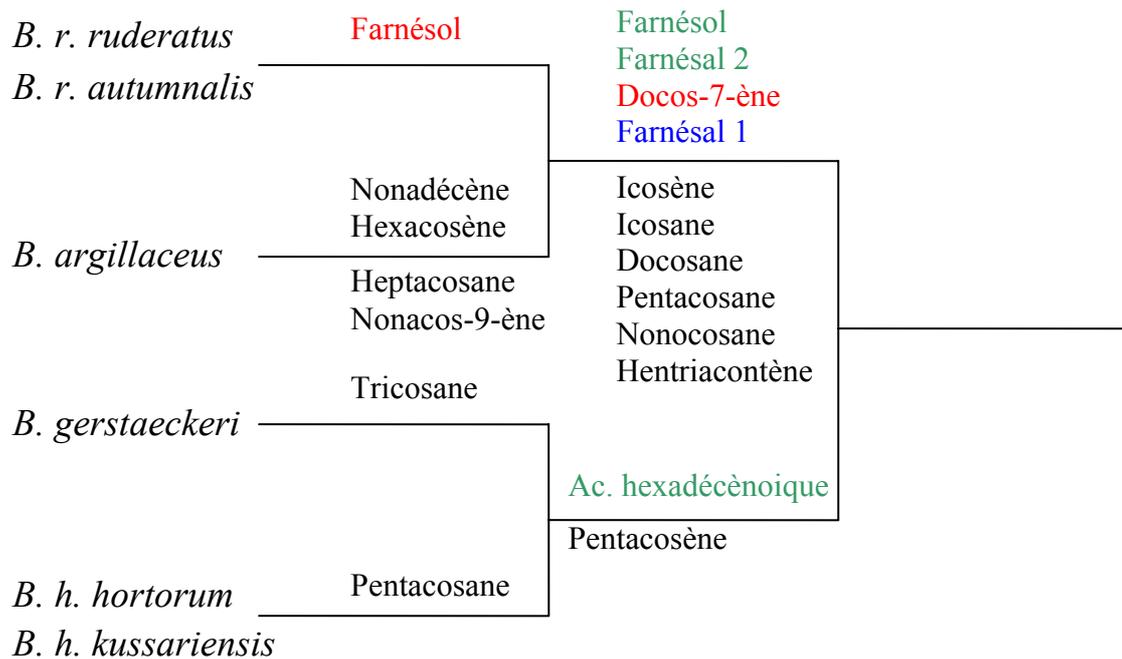
Le reclassement des individus sur base de l'ensemble des composés permet un reclassement correct des individus au sein des taxons étudiés dans 90,47% des cas. Les seules erreurs se produisent entre sous-espèces

#### 4.2.4. Groupements

Nous avons fait un groupement (Consensus strict UPGMA) des individus selon leur similitude des composés des sécrétions des glandes labiales céphaliques (matrice de corrélation de Phi). Il est réalisé à partir de la matrice binaire 63 individus\*34 composés (Fig. 9).



**Figure 9.** Dendrogramme représentant les affinités entre les différents taxons en fonction de la composition de leurs sécrétions labiales (Consensus strict UPGMA- corrélation de Phi). rud: *Bombus ruderatus ruderatus*; aut: *B. ruderatus autumnalis*; arg: *B. argillaceus*; ger: *B. gerstaeckeri*; hor: *B. hortorum hortorum*; kus: *B. hortorum kussariensis*.



**Figure 10. Composés caractéristiques des différents taxons.** (Consensus strict UPGMA- corrélation de Phi). En vert: composé caractéristique des taxons au seuil de 1%; en bleu: composé caractéristique des taxons au seuil de 10%; en rouge: composé caractéristique des taxons au seuil de 5%; en gris: composé caractéristique des taxons au seuil de 50%.

## 5. Discussion

### 5.1. Composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques

Parmi les 4 espèces prises en compte pour cette étude, seules les sécrétions labiales céphaliques de *B. hortorum* sont connues (Appelgren, 1991). Toutefois, avant 1996, seuls les composés majeurs étaient considérés lors des analyses de ces sécrétions (Terzo *et al.*, 2003). A cette époque, cela était suffisant car le but premier des chercheurs était de mettre en évidence la spécificité des phéromones sexuelles des mâles de bourdons. Les composés présents en trace n'étaient pas identifiés car ils étaient alors considérés comme inutiles pour la reconnaissance spécifique.

Les composés majeurs de *B. hortorum* identifiés par Appelgren (1991) sont les suivants: farnésal, géranylgeranial, octadécène et nonadécène. On les a également trouvés en quantité plus ou moins semblable (Tab. 6). Les présentes analyses y ajoutent 13 composés mineurs (Tab. 4 et 5).

**Tableau 6. Proportion (%) des composés majeurs trouvés chez *B. hortorum* par Appelgren (1991) et lors du présent travail**

	<b>Appelgren (1991)</b>	<b>Présent travail</b>
Farnésol	17	17
Géranylgéraniol	21	18
Octadécène	7	<1
Nonadécène	55	50

En dehors de *B. consobrinus* (non étudié ici), les sécrétions des autres taxons de *Megabombus* n'ont jamais été étudiées. Leur description est présentée ici pour la première fois (Tab. 4 et 5). Tous les composés détectés ont déjà été trouvés chez d'autres bourdons. Il n'y a donc pas chez les *Megabombus* de composé unique à ce sous-genre ni même à l'une de ses espèces. Toutefois, comme Appelgren (1991) l'a montré, le nonadécène est une molécule majeure chez *B. hortorum* et est même la molécule principale pour 5 des 6 taxons étudiés ici.

En dehors des *Megabombus*, cette molécule n'est présente qu'à l'état de trace (<0.1%) chez *B. (Metapsithyrus) campestris* (Panzer) (Urbanova *et al.*, 2004) et absente chez toutes les autres espèces étudiées jusqu'ici.

Le nonadécène apparaît comme un composé caractéristique des *Megabombus*. La présence d'un composé caractéristique de toutes les espèces d'un même sous-genre a déjà été mise en évidence. C'est le cas de l'éthylododécanoate que l'on trouve chez toutes les espèces du sous-genre *Bombus* et qui n'existe pas en dehors de ce sous-genre (Terzo *et al.*, 2003).

Cette découverte d'un composé caractéristique à l'ensemble des espèces du sous-genre *Megabombus* vient à nouveau renforcer l'importance des sécrétions labiales céphaliques pour toute étude phylogénétique selon le concept moderne d'analyse phylogénétique globale (*Total evidence approach*) comme suggéré par Terzo *et al.*, (2003).

Outre la présence de ce composé caractéristique des *Megabombus* (nonadécène), les 6 taxons de *Megabombus* pris en compte pour cette étude présentent tous une quantité élevée d'hydrocarbures dans leurs sécrétions labiales céphaliques.

Chez les autres bourdons, au contraire, les hydrocarbures ne sont généralement présents que sous forme de traces (Tab. 7).

Pour certains auteurs, ceux-ci sont considérés comme des molécules peu volatiles qui ne jouent pas ou peu de rôle dans l'attraction sexuelle (Bergman, 1997). Notre étude des *Megabombus* montre clairement qu'ils constituent les composés majeurs des sécrétions et, par conséquent, qu'ils peuvent peut-être jouer un rôle.

La forte présence d'hydrocarbures dans les sécrétions des mâles de bourdons est donc une deuxième caractéristique importante du sous-genre *Megabombus*.

Chez *Bombus ruderatus* et *B. argillaceus*, les terpènes ne représentent que des composés mineurs. Les composés à fonction terminale oxygénée ne se trouvent ni en grand nombre, ni en grande quantité, alors que c'est généralement le cas chez la plupart des autres bourdons (Bergström *et al.*, 1980)

**Tableau 7. Surface relative (%) des alcanes et alcènes dans les sécrétions des glandes labiales céphaliques de plusieurs espèces de différents sous-genres de bourdons**

Origine des données	Sous-genre	Espèce	Sous-espèce	Proportion d'hydrocarbure
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. ruderatus</i>	<i>ruderatus</i>	92,28
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. ruderatus</i>	<i>autumnalis</i>	89,82
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. argillaceus</i>	-	94,53
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. gerstaeckeri</i>	-	44,51
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. hortorum</i>	<i>hortorum</i>	62,55
*	<i>Megabombus</i>	<i>B. hortorum</i>	<i>kussariensis</i>	68,40
**	<i>Pyrobombus</i>	<i>B. perplexus</i>	-	12,00
***	<i>Psithyrus</i>	<i>B. rupestris</i>	-	30,30
****	<i>Bombus</i>	<i>B. lucorum</i>	-	12,07
*****	<i>Bombus</i>	<i>B. terrestris</i>	<i>dalmatinus</i>	22,49

\*: présent travail; \*\*: Bertsch *et al.*, 2003; \*\*\*: Urbanová *et al.*, 2004; \*\*\*\*: Urbanová *et al.*, 2001; \*\*\*\*\*: Coppée, 2005.

## 5.2. Statut spécifique des taxons

### 5.2.1. Groupes d'espèces

Des groupes d'espèces apparaissent sur base du clustering (Fig. 9). Le premier groupe est formé par *B. ruderatus* et *B. argillaceus*. Le second est formé par *B. gerstaeckeri* et *B. hortorum*. Le géranylgeranial 2 semble être le composé principal qui permet la distinction de ces 2 groupes. Chez *B. gerstaeckeri* et *B. hortorum*, les terpènes, y compris le géranylgeranial 2, sont beaucoup plus abondants. Chez *B. ruderatus* et *B. argillaceus*, la voie métabolique des terpènes semble avoir presque totalement disparu. Cette divergence évolutive a déjà été mise en évidence par Bergman (1997) dans le cas du couple d'espèces formé par *B. terrestris* et *B. lucorum*. Ces 2 dernières espèces sont morphologiquement et phylogénétiquement très proches. Leurs sécrétions labiales céphaliques, bien que différentes à première vue, sont fortement semblables si ce n'est l'absence des terpènes chez *B. lucorum*. Bergman émet l'hypothèse que la disparition de la voie des terpènes chez *B. lucorum* peut être apparue à la suite d'une simple mutation.

Des traces de farnésol subsistent chez *B. ruderatus*, tandis que les sécrétions labiales céphaliques de *B. argillaceus* sont totalement dépourvues de terpènes.

### 5.2.2. Le cas de *Bombus argillaceus*

*B. argillaceus* est considéré comme l'espèce sœur de *B. ruderatus*. Scholl *et al.*, (1992) observent quelques rares hybrides de ces 2 espèces dans certaines localités du sud-est de la France. Lorsque ces deux espèces sont sympatriques, elles s'excluent. De plus, leur écologie est légèrement différente (Rasmont, 1988). C'est pour ces raisons qu'elles sont considérées comme espèces bien séparées.

L'analyse des sécrétions labiales céphaliques de *B. argillaceus* conforte cette idée. En effet, l'analyse en composantes principales sépare bien les 2 espèces. Leurs compositions se ressemblent, sans toutefois être identiques. Certaines molécules ne sont présentes que chez une ou l'autre espèce.

Les analyses en composantes principales séparent les *B. argillaceus* en 2 groupes. Or, tous les spécimens ont été collectés au même endroit et à la même période. Peut-être s'agit-il de 2 groupes d'âges différents (Ågren *et al.*, 1979; Coppée, 2005) ou de 2 populations distinctes? Il est difficile de trouver une réponse. Cela pourrait peut-être provenir d'une forte variation individuelle de leur composé majeur, le nonadécène. En effet celui-ci varie de 91,17% à 33,07% selon l'individu. Une telle différence de proportion est observée, pour d'autres composés, chez *B. terrestris*, et cela en fonction de l'âge de l'individu (Coppée, 2005).

### 5.2.3. Le cas de *Bombus ruderatus*

L'analyse en composantes principales permet de bien séparer les différents taxons étudiés, à l'exception de *B. ruderatus ruderatus* et *B. ruderatus autumnalis*.

Comme cela a été montré par Terzo *et al.*, (2005) pour *B. ruderarius* et *B. sylvarum*, les premières composantes de l'ACP, celles qui expriment la plus grande variance, permettent de distinguer les espèces. Ce n'est pas le cas ici pour *B. ruderatus ruderatus* et *B. ruderatus autumnalis*.

La composition de leurs sécrétions labiales céphaliques est extrêmement similaire. Les composés majeurs sont identiques. C'est également le cas pour la grande majorité des composés mineurs. Cela conforte l'idée qu'il s'agit de taxons conspécifiques.

D'un point de vue morphologique, ces deux taxons diffèrent uniquement par la couleur du pelage des pattes postérieures: roussâtre chez *B. ruderatus ruderatus* et noir chez *B. ruderatus autumnalis*.

L'analyse des sécrétions labiales céphaliques d'un autre couple de taxons proches (Terzo *et al.*, 2005), *B. ruderarius ruderarius* et *B. ruderarius montanus*, a montré que l'analyse en composantes principales ne peut les séparer. Comme dans ce dernier cas, il est probable que *Bombus ruderatus autumnalis* et *B. r. ruderatus* ne constituent bien que de simples sous-espèces. Ceci confirme leur statut généralement reconnu.

La découverte, au sein d'un même nid, de spécimens des 2 types de colorations différentes permettrait de valider cette hypothèse.

L'analyse en composantes principales et l'analyse en composantes principales précédée de la méthode d'Escoufier ont respectivement isolé un et deux *B. ruderatus ruderatus* du groupe principal. Il s'agit peut-être de spécimens d'âges différents (Ågren *et al.*, 1979; Coppée, 2005).

#### 5.2.4. Le cas de *Bombus hortorum*

Contrairement à *B. ruderatus*, l'analyse en composantes principales a clairement séparé les 2 sous-espèces de *B. hortorum*. La plus forte différence entre *B. h. hortorum* et *B. h. kussariensis* est la proportion de farnésol et de farnésal (Tab. 8). Il s'agit d'une variation de proportion pour des composés majeurs. Cela est assez atypique pour des taxons considérés comme conspécifiques.

**Tableau 8. Surface relative (%) du farnésol et du farnésal 2 dans les sécrétions des glandes labiales céphaliques de *B. h. hortorum* et *B. h. kussariensis***

Taxons	Farnésol	Farnésal
<i>B. h. hortorum</i>	16,55	2,05
<i>B. h. kussariensis</i>	2,17	13,08

A part la couleur du pelage, il n'y aucune différence morphologique entre *B. hortorum hortorum* et *B. hortorum kussariensis*. Ces 2 critères associés à leur isolation géographique semblent bien justifier leurs statuts conspécifiques.

Toutefois, le farnésol et le farnésal, responsables de la principale distinction entre *B. hortorum hortorum* et *B. hortorum kussariensis*, sont des composés majeurs (>1%). Cela semble plutôt indiquer une différence d'ordre spécifique plutôt que subsppécifique.

Rasmont *et al.*, (sous presse) ont analysé les sécrétions labiales céphaliques de deux espèces de bourdons du sous-genre *Sibiricobombus* Vogt: *B. niveatus* Kriechbaumer et *B. sulfureus* Friese. Ils ne diffèrent que par un composé majeur secondaire, le géranylgéranial. Leurs sécrétions sont les mêmes, à l'exception de ce dernier composé qui représente 13% des sécrétions chez *B. niveatus* et qui est absent des sécrétions chez *B. sulfureus*. Cela confirme l'importance d'un tel composé pour la reconnaissance spécifique.

L'analyse en composantes principales sépare donc *B. h. hortorum* et *B. h. kussariensis* en fonction de la variation de la composition de leurs sécrétions labiales céphaliques. On ne sait pas si cette variation est due à leurs séparations géographiques ou au fait qu'il s'agisse d'espèces distinctes.

Il faudrait aussi se demander si les femelles des deux taxons sont sensibles à la différence de proportion entre le farnésol et le farnésal, qui sont des molécules très semblables. Il faudrait donc faire des tests biologiques.

Il y a donc des arguments en faveur et en défaveur du fait que *B. hortorum hortorum* et *B. hortorum kussariensis* fassent partie d'une même espèce.

#### **5.2.5. Le cas de *Bombus gerstaeckeri***

Ce taxon est considéré comme une bonne espèce (Tkalcu, 1969; Löken, 1973).

L'analyse de ses sécrétions montre bien son appartenance au sous-genre *Megabombus*, sans toutefois reconsidérer son statut.

## 6. Conclusions

### 6.1. Composition des sécrétions

Les composés majeurs (>1%) des sécrétions labiales céphaliques des mâles de bourdons du sous-genre *Megabombus* sont donc les suivants:

- *Bombus ruderatus ruderatus*: nonadécène (57,62%), hénicosane (5,71%), tricosane (5,41%), nonadécane (5,11%), acide tétradécénoïque + éthyltétradécénate (4,19%), heptadécane (4,11%), octadécène (3,88%), hénicosène (2,99%), farnésol (2,65%) et icosène (1,78%).
- *Bombus ruderatus autumnalis*: nonadécène (63,81%), acide tétradécénoïque + éthyltétradécénate (5,54%), tricosane (5,11%), hénicosane (4,81%), nonadécane (4,03%), farnésol (3,63%), hénicosène (3,01%), icosène (2,37%) et octadécène (2,14%).
- *Bombus argillaceus*: nonadécène (68,81%), tricosane (6,74%), acide tétradécénoïque + éthyltétradécénate (5,54%), nonadécane (3,65%), hénicosane (3,60%), pentacosène (3,49%), octadécène (1,89%) et hénicosène (1,54%).
- *Bombus gerstaeckeri*: géranylgéranial 2 (41,90%), nonadécène (38,73%), géranylcitronellol (13,08%), nonadécane (1,98%), hénicosane (1,74%) et tricosane (1,08%).
- *Bombus hortorum hortorum*: nonadécène (49,97%), farnésol (16,55%), géranylgéranial 2 (13,77%), hénicosane (5,45%), nonadécane (5,02%), géranylgéranial 1 (4,32%), octadécénol (2,93%), farnésal 2 (2,05%) et tricosane (1,24%).
- *Bombus hortorum kussariensis*: nonadécène (52,10%), farnésal 2 (13,08%), géranylgéranial 2 (8,43%), nonadécane (7,40%), hénicosane (4,87%), géranylgéranial 1 (2,83%), farnésal 1 (2,38%), octadécénol (2,28%), farnésol (2,17%) et icosane (1,36%).

## 6.2. Statuts spécifiques

Les différences de composition entre chacune de ces espèces sont claires, ce qui nous permet de valider leurs statuts.

Les différences de composition des taxons au sein d'une même espèce ne nous permettent pas de définir précisément leurs statuts. Des tests biologiques devraient être réalisés pour éclaircir ces statuts.

## 6.3. Groupes d'espèces

Sur base de leurs sécrétions des glandes labiales céphaliques, deux groupes d'espèces ont pu être distingués: le premier groupe formé de *B. ruderatus* et de *B. argillaceus*, le deuxième formé de *B. gerstaeckeri* et de *B. hortorum*.

## 6.4. Composition caractéristique des *Megabombus*

Il n'y a pas de composé unique à ce sous-genre, ni même à l'une de ses espèces. Toutefois, le nonadécène apparaît comme un composé caractéristique des *Megabombus*. Une autre caractéristique commune à ce sous-genre est la forte quantité d'hydrocarbures présents dans leurs sécrétions labiales céphaliques.

## 7. Bibliographie

- Ågren L., Cederberg B. & Svensson Bo G., 1979.** Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera Apidae). *Zoon*, 7: 1-14.
- Appelgren M., Bergström G., Svensson Bo G. & B. Cederberg, 1991.** Marking Pheromones of *Megabombus* Bumblebee Males. *Acta Chemica Scandinavica* 45, 972-974
- Awram W.J., 1970.** *Flight route behaviour of Bumblebees*. Ph. D. Thesis, University of London, 173 pp.
- Bergman P., 1997.** *Chemical Communication in Bumblebee Premating Behaviour*. Ph. D. Thesis, Faculty of Natural Sciences, Göteborg University.
- Bergström G., 1980.** Complexity of exocrine signals in Aculeate Hymenoptera. Pp. 35-47 in Les colloques de l'INRA, *Les Pheromones sexuelles et les médiateurs chimiques chez les insectes: utilisation en lutte intégrée*, Colmar, 25-27 novembre 1980.
- Bergström G., 1981.** Chemical aspects of insects exocrine signals as a means for systematic and phylogenetic discussions in aculeate Hymenoptera. *Entomol. Scand. Suppl.1*, 15: 173-184.
- Bergström G. & Svensson Bo G., 1973.** Characteristic marking secretions of the forms *lapponicus* and *scandinavicus* of *Bombus lapponicus* Fabr. (Hymenoptera, Apidae). *Chemica Scripta*, 4: 231-238.
- Bergström G., Svensson Bo G., Appelgren M. & Groth I., 1981.** Complexity of Bumble Bee Marking Pheromones: Biochemical, Ecological and Systematical Interpretations, in: *Biosystematics of Social Insects*, Howse E., Clément J.-L. (Eds.), Academic press, London & New York, pp. 175-183.
- Bertsch A., Schweer H. & Titze A., 2003.** Analysis of the labial Gland Secretions of the male Bumble Bee *Bombus perplexus* Cresson (Hymenoptera: Apidae) from North America. *Z. Naturforsch.* 59c: 263-270.
- Calam D.H., 1969.** Species and sex-specific compounds from the heads of male bumblebees (*Bombus* spp.). *Nature*, 221: 856-857.
- 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'étude, Université de Mons-Hainaut, 56 pp.
- Dufrêne M. & P. Legendre, 1997.** Species assemblages and indicator species: the need for a flexible asymmetrical approach. *Ecological Monographs*, 67: 345-366.
- Dylewska M., 1958.** The *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. fauna of the polish part of the Tatry Mountains. *Acta zoologica Cracoviense*, 3(5): 138-197.
- Escoufier Y., 1970.** Echantillonnage dans une population de variables aléatoires réelles. *Publication de l'Institut de Statistique de l'Université de Paris*, 19:1-47.
- Haas A., 1952.** Die Mandibeldrüse als Duftorgan bei einigen Hymenopteren. *Naturwissenschaften* 39: 484.

- Krüger E., 1920.** Beiträge zur Systematik und Morphologie der mittel-europäischen Hummeln. *Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik*, 42: 289-464.
- Kruseman G., 1959.** Enkele zoogeographische opmerkingen over de hommelfauna van Zweden (hym., Apid.). *Entomologische berichten, Amsterdam*, 19(1): 49-51.
- Kullenberg B., Bergström G. & Ställberg-Stenhagen S., 1970.** Volatile Components of the cephalic marking Secretion of male Bumble bees. *Acta Chem. Scand.*, 24(4): 1481-1483.
- Kullenberg B., Berström G., Bringer B., Carlberg B. & Cederberg B., 1973.** Observations on Scent Marking by *Bombus* Latr. And *Psithyrus* Lep. Males (Hym., Apidae) and Localization of Site of production of the Secretion. *Zoon, Suppl.* 1: 23-30
- Löken A., 1973.** Studies on Scandinavian Bumble Bees (Hymenoptera, Apidae). *Norsk entomologisk Tidsskrift*, 20(1): 1-218.
- Pittioni B., 1938.** Die Hummeln und Schmarotzerhummeln der Balkan-Halbinsel mit besonderer Berücksichtigung der Fauna Bulgariens. I: Allgemeiner Teil. *Mitteilungen aus den Königlichen Naturwissenschaftlichen Instituten in Sofia*, 11: 12-69.
- Pittioni B., 1939.** Hummeln und Schmarotzerhummeln der Balkan-Halbinsel mit besonderer Berücksichtigung der Fauna Bulgariens. II: Spezieller Teil. *Mitteilungen aus den Königlichen Naturwissenschaftlichen Instituten in Sofia*, 12: 49-122, 6pls.
- Pittioni B. & Schmidt R., 1942.** Die Bienen des südöstlichen Niederdonau. I: Apidae, Podaliriidae, Xylocopidae und Ceratinidae. *Niederdonau, Natur und Kultur*, 19: 1-69.
- R Development Core Team, 2004.** *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Rasmont P., 1988.** *Monographie écologique et zoogéographique des Bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae)*. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux, 310 + LXII pp.
- Rasmont P. & Flagothier D., 1996.** *Biogéographie et choix floraux des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Turquie*. N.A.T.O.-O.T.A.N. TU- Pollination project, rapport préliminaire, Université de Mons-Hainaut, Adana Çukurova Universitesi, 69 + 3 pp.
- Rasmont P., Terzo M., Aytakin M., Hines H. & Urbanova K., sous presse.** Cephalic secretions of the bumblebee subgenus *Sibiricobombus* Vogt suggests *Bombus niveatus* Kriechbaumer and *Bombus vorticosus* Gerstaecker are conspecific (Hymenoptera, Apidae, Bombus). *Apidologie*, 15pp.
- Rasmont P & Terzo M., en préparation.** *West Palaearctic Bumblebees*. Apollo Book, 500pp.
- Reinig W.F., 1965.** Die Verbreitungsgeschichte zweier für die Apenninen neuer borealpinen Hummelarten mit einem Versuch der Gliederung borealpinen Verbreitungsformen. *Jahrbücher, Abteilung für Systematik*, 92: 103-142.
- Reinig W.F., 1983.** Symopsis der in Europa nachgewiesenen Hummel- und Schmarotzerhummelarten (Hymenoptera, Bombidae). *Spixiana, München*, 4: 159-164.
- Rohlf F.J., 1993.** *NTSYS-pc version 1.8. Numerical and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistic Inc., New-york, 242pp.

- Scholl A., Obrecht E. & Zimmerman M., 1992.** Evidence of hybridation of *Bombus argillaceus* and *Bombus ruderatus* (Hymenoptera: Apidae) in a zone of contact in France: enzyme electrophoretic data. *Proceeding of the XIX international Congress of Entomology, Beijing*, p.53.
- Svensson Bo G., 1980.** *Species-Isolating Mechanisms in Male Bumble Bees (Hymenoptera, Apidae)*. Doctoral dissertation at Uppsala University, 42pp.
- Terzo M., Urbanova K., Valterova I. & Rasmont P., 2005.** Intra and interspecific variability of the cephalic labial glands' secretions in male bumblebees: the case of *Bombus (Thoracobombus) ruderarius* and *B. (Thoracobombus) sylvarum* [Hymenoptera, Apidae], *Apidologie* 36, 85-96.
- Terzo M., Valterova I., Urbanova K. & Rasmont P., 2003.** De la nécessité de redécrire les phéromones sexuelles des mâles de bourdons [Hymenoptera: Apidae, Bombini] publiés avant 1996 pour leur utilisation en analyse phylogénétique, *Phytoprotection*, 84: 39-49.
- Tkalcu B., 1969.** Ergebnisse der Albanien-Expedition 1961 des Deutschen Entomologischen Institutes. 78. Beitrag. Hymenoptera: Apidae IV (Bombinae). *Beiträge zur Entomologie*, 19(7/8): 887-916.
- Urbanová K., Kalik J., Hovorka O., Kindl J. & Valterová I., 2004.** Marking pheromones of the cuckoo bumblebee males (Hymenoptera, Apoidea, *Bombus* Latreille): compositions of labial gland secretions of six species found in the Czech Republic. *Biochemical Systematics and Ecology* 32 1025-1045.
- Urbanová K., Valterová I., Hovorka O. & Kindl J., 2001.** Chemotaxonomical characterisation of males of *Bombus lucorum* (Hymenoptera: Apidae) collected in the Czech Republic. *Eur. J. Entomol.* 98: 111-115.

## 8. Annexe: Scripts du logiciel R

### 8.1. Analyse en Composantes Principales

```
edit(AS)

#standardisation et transformations
AS.l <- log1p(AS. [1:34]) # Log
edit(AS.l)
#ecart-type
AS.ls <- apply(AS.l, 2, scale)
invisible(edit(AS.ls))
#moyenne
AS.ls.mean <- apply(AS.ls, 2, mean)

#Escoufier
library (pastecs)
AS.ls.esc <- escouf(AS.ls)
plot(AS.ls.esc)
# selection des variables pour ACP (AS.ls.esc)
AS.esc <- AS.ls[ , c(24, 13, 5, 17, 8, 21, 31, 6, 19, 4)]
edit(AS.esc)

#ACP
library(MASS)
(AS.pc <- princomp (AS.esc, cor = TRUE))
summary(AS.pc)
plot(AS.pc)

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

# Graphe en 3D des 3 premiers axes de l'ACP
(AS.ind3 <- predict (AS.pc, dimen= 3))
coord3D <- AS.ind3[, 1:3]
coord3D <- as.data.frame(coord3D)
coord3D$Species <- AS$Species
scatter3d(coord3D$Comp.1, coord3D$Comp.2, coord3D$Comp.3,
group=coord3D$Species, surface=FALSE, bg="white", grid=FALSE, xlab="Comp1",
ylab="Comp3", zlab="Comp2")
```

## 8.2. Analyse Linéaire Discriminante

```
edit(AS)
```

```
# Analyse lda
```

```
library(MASS)
```

```
AS.lda <- lda(Species ~ ., data=AS)
```

```
plot(AS.lda)
```

```
# Matrice de confusion sur l'ensemble
```

```
AS.conf <- table(predicted=AS.ind$class, observed=AS$Species)
```

```
AS.conf
```

```
# Taux global de séparation des groupes
```

```
sum(diag(AS.conf)) / sum(AS.conf) * 100
```

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

```
(AS.ind3 <- predict(AS.lda, dimen = 3))
```

```
coord3D <- AS.ind3$x[, 1:3]
```

```
coord3D <- as.data.frame(coord3D)
```

```
coord3D$Species <- AS$Species
```

```
scatter3d(coord3D$LD1, coord3D$LD3, coord3D$LD2, group=coord3D$Species,  
surface=FALSE, bg="white", grid=FALSE, xlab="LD1", ylab="LD3", zlab="LD2")
```