

UNIVERSITE MONS-HAINAUT

-

FACULTE DES SCIENCES

-

LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires
spécialistes sur saule**

Directeur de mémoire
Dr. Denis Michez
Rapporteurs : Prof. Georges Lognay,
Prof. Pierre Rasmont et Dr. Ruddy Wattiez

Mémoire de fin d'Etudes
Présenté par **Maryse
Vanderplanck**
En vue de l'obtention du grade
de **Maître en Biologie des
Organismes et Ecologie**

Année académique 2008-2009

M. Vanderplanck, 2009. *Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires spécialistes sur saule.* Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université Mons-Hainaut, 148p.

Résumé: *Colletes cunicularius* (L.) et *Andrena vaga* (Panzer), deux espèces solitaires printanières psammophiles, ont été qualifiées d'oligolectiques strictes sur *Salix* (Salicaceae). Cependant, des observations relativement récentes ont démontré le caractère polylectique de *Colletes cunicularius*. Lors de cette étude, le polylectisme de *Colletes cunicularius* a été confirmé suite aux analyses au microscope optique des charges scopales des femelles et des cellules larvaires de chacune des deux espèces. Ainsi, si les femelles d'*Andrena vaga* collectent du pollen uniquement sur *Salix*, il semblerait que les femelles de *Colletes cunicularius* collectent exclusivement sur saule au début du printemps et modifient leurs choix floraux en fin de floraison de leur plante hôte. Actuellement, les interactions plante-abeille et la compréhension des mécanismes qui les régissent demeurent encore extrêmement fragmentaires. Il est possible que les facteurs diététiques y jouent un rôle clef, en particulier l'hypothèse d'une contrainte évolutive liée aux stérols sur les choix alimentaires des abeilles n'a jamais été testée. C'est sur cette hypothèse que se penche le présent travail.

Pour ce faire, une méthode d'analyse stérolique mico-quantitative a été développée. Les profils stéroliques des deux espèces ont été établis pour chacun des stades du cycle et semblent diverger significativement les uns des autres tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Ainsi, il semblerait d'une part, que le cholesténone soit présent uniquement dans les profils tissulaires de l'espèce oligolectique et d'autre part, que *Colletes cunicularius* tolère une variabilité stérolique de plus grande ampleur en terme de ressources alimentaires, variabilité qui se reflète au sein de ses stérols tissulaires. Cependant, le métabolisme stérolique sous-jacent pourrait être identique, les deux espèces semblant incapables de désalkyler les phytostérols en cholestérol.

Néanmoins, la certitude des résultats obtenus est limitée par la possible influence de facteurs non pris en compte au cours de ce travail tels que le stade larvaire ou la maturation des ovarioles. Les conclusions restent provisoires et les constatations hypothétiques étant donné que ce travail s'axe principalement sur l'aspect descriptif des profils stéroliques de ces deux espèces.

Mots-clés: *Andrena vaga*, *Colletes cunicularius*, *Salix* sp., spécialisation, stérols.

Remerciements

Parce que tout travail scientifique est le fruit d'une collaboration étroite, je tiens à remercier par ces quelques lignes toutes les personnes qui ont permis que ce mémoire se réalise.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Pierre RASMONT de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Zoologie. Il m'a communiqué tout au long de ces quatre dernières années d'étude à l'Université de Mons sa passion et son enthousiasme pour la zoologie à travers son enseignement aussi bien académique que lors des excursions, nous faisant partager anecdotes et réflexions.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur Georges LOGNAY (Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux) pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein du laboratoire de Chimie Analytique et pour m'avoir permis de préparer ce mémoire dans les meilleures conditions, mettant tout le matériel à ma disposition. Je tiens à le remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude, partageant aussi bien les moments de doute que ceux de satisfaction.

Je tiens également à exprimer tous mes sincères remerciements au Docteur Denis MICHEZ pour avoir dirigé ce mémoire. Ses compétences scientifiques, ses encouragements dans mes moments de doute et la confiance qu'il m'a accordée m'ont permis de mener à bien ce travail. Je tiens encore à lui exprimer ma profonde gratitude pour son aide et tous ses précieux conseils.

Je suis très honorée de la présence au titre de rapporteurs du Professeur Pierre RASMONT, du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons, et du Professeur Georges LOGNAY, du laboratoire de Chimie Analytique de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux. Je remercie aussi le Docteur Ruddy WATTIEZ, du service de Protéomie et Biochimie des Protéines de l'Université de Mons, d'avoir accepté de participer à ce jury.

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe du laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons - y compris les mémorants qui ont partagé cette année pleine de péripéties - pour leur écoute, leur disponibilité et leur aide ; ceci avec une pensée toute particulière envers Monsieur Laurent CREPIN pour sa gentillesse, son soutien, son humour et son efficacité qui m'ont été très utiles lors de ce travail.

Je suis aussi très reconnaissante envers Madame Sophie VANCRAENENBROEK de la Faculté universitaire des Sciences agronomiques de Gembloux pour son soutien et ses précieux conseils ainsi que pour son aide, sa disponibilité, sa bonne humeur et son amitié. Ces remerciements s'adressent également à tous les membres du laboratoire de Chimie Analytique ainsi qu'aux membres du BEAGx qui m'ont toujours apporté leur soutien, tant amical que scientifique.

Un grand merci à Monsieur BAUWENS, responsable de la gestion de la réserve naturelle de la Grande-Bruyère, de nous avoir permis de collecter le matériel nécessaire à l'élaboration du présent travail.

Je tiens aussi à remercier le Docteur Ariane REGALI pour m'avoir fourni les documents relatifs à son étude, Monsieur Gilles MAHE pour la collecte qu'il a réalisée en Loire-Atlantique dans le seul but de m'aider ; ainsi que Monsieur Etienne BRUNEAU pour certaines des analyses microscopiques réalisées, Monsieur Paul POSTIAUX du service de Biologie Marine de l'Université de Mons pour ses conseils et l'aide qu'il m'a prodigués lors des photographies effectuées au SEM, le Docteur Nicolas VERECKEN pour les magnifiques clichés qui illustrent ce travail et enfin, Monsieur Julien LEBLUD du laboratoire d'Ecologie numérique des milieux aquatiques dirigé par le Professeur Philippe GROSJEAN, pour son aide et ses conseils statistiques.

A Kevin, pour sa patience et son soutien lors de mes moments de doute aussi bien expérimentaux que rédactionnels ; sa bonne humeur, sa gentillesse, son aide et son amour qui m'ont soutenue tout au long de ce travail et des incessants allers-retours Soignies-Gembloux.

Un merci tout particulier à mes amis: Jérôme, Jérémy, Bychon, Belette, Paula, Stéphanie, Emeline et Magali.

Je tiens enfin à exprimer toute ma gratitude à ma famille dont le soutien a été essentiel tout au long de mes études, et tout particulièrement au cours de ce travail. A ma sœur et à mon frère, Céline et Bertrand, à mes parents et mes grands-parents, pour leur aide et leurs encouragements de tous les jours. Sans eux, rien ne serait possible.

! "#\$%& % (& " *+, -% (&

1. Introduction.....	8
1.1. Ecologie des abeilles solitaires.....	9
1.1.1. Systématique et phylogénie.....	9
1.1.2. Répartition géographique et centre de diversité.....	11
1.1.3. Histoire naturelle	12
1.2. Relation entre plantes et abeilles (Hymenoptera, Apoidea)	13
1.3. Métabolisme stérolique	23
1.3.1. Les stérols.....	23
1.3.2. Les phytostérols	24
1.3.3. Etat actuel des connaissances.....	24
1.4. Modèles biologiques	31
1.4.1. <i>Andrena vaga</i> (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae)	31
1.4.2. <i>Colletes cunicularius</i> (L.) (Hymenoptera, Colletidae).....	35
1.5. Objectif	40
2. Matériel et méthode	42
2.1. Echantillonnage et conservation du matériel biologique.....	42
2.1.1. Situations géographiques des sites de capture des abeilles et descriptions.....	42
2.1.1.1. Grande Bruyère de Blaton.....	42
2.1.1.2. Dunes de Pont-Mahé.....	43
2.1.2. Pollen	45
2.1.2.1. Pollen floral collecté manuellement.....	46
2.1.2.2. Pollen collecté par les femelles d'abeilles	46
2.1.3. Pains de pollen	47
2.1.4. Larves.....	47
2.1.5. Adultes	49
2.2. Analyses palynologiques	50
2.2.1. Grande Bruyère de Blaton	50
2.2.2. Dunes de Pont-Mahé	50
2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives.....	51
2.3.1. Préparation de la fraction insaponifiable	52
2.3.2. Fractionnement de l'extrait insaponifiable.....	53
2.3.3. Récupération des stérols	55
2.3.4. Analyse GC / GC-MS.....	56
2.4. Analyses statistiques.....	60

2.4.1. Généralités	60
2.4.2. Données brutes	61
2.4.3. Pré-traitement	61
2.4.4. Analyses multivariées	62
2.4.4.1. Analyse en composantes principales.....	62
2.4.4.2. Méthode de classification hiérarchique (dendrogramme)	63
2.4.4.3. Analyse de la variance multivariée.....	64
2.4.4.4. Test Hotelling T^2	65
2.4.4.5. Tests univariés	66
2.4.4.6. Démarche statistique.....	67
2.4.4.5. Logiciel	67
3. Résultats.....	68
3.1. Observations éthologiques sur le terrain	68
3.2. Analyses palynologiques	68
3.2.1. Grande-Bruyère de Blaton.....	68
3.2.2. Dunes de Pont-Mahé	72
3.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives.....	74
3.3.1. Adaptation de la méthode d'analyse des stérols de Lognay <i>et al.</i> (1989, 1992).....	74
3.3.1.1. Préparation de l'échantillon.....	74
3.3.1.2. Saponification.....	75
3.3.1.3. Extraction.....	75
3.3.1.4. Chromatographie sur couche mince.....	75
3.3.1.5. Silylation	76
3.3.1.6. Chromatographie en phase gazeuse (CPG).....	76
3.3.1.7. Analyse GC-MS	77
3.3.2. Analyses stéroliques	78
3.3.2.1. Chromatogrammes et caractérisation des profils stéroliques.....	78
3.3.2.2. Analyses statistiques interspécifiques	92
3.3.2.3. Analyses statistiques intraspécifiques.....	99
4. Discussion.....	114
4.1. Oligolectisme et polylectisme	114
4.2. Discussion de la méthode d'analyse stérolique micro-quantitative	115
4.3. Métabolisme stérolique	116
4.3.1. Nature des stérols polliniques	116
4.3.2. Nature des stérols des pains de pollen (<i>Salix</i> sp.)	118
4.3.3. Stérols tissulaires.....	119

4.3.4. Variabilité interindividuelle	123
4.3.5. Métabolisme stérolique et spécialisation alimentaire.....	124
5. Conclusion.....	125
6. Perspectives.....	126
6.1. Perspectives analytiques	126
6.2. Perspectives biologiques	127
7. Bibliographie	129
8. Annexes.....	146
8.1. Annexe 1: liste des échantillons.....	146
8.2. Annexe 2: liste des stations	151
8.3. Annexe 3: scripts des analyses dans R	152
8.4. Annexe 4: publication associée au mémoire de fin d'études	160

1. Introduction

Contrairement aux idées reçues, la grande majorité des espèces d'abeilles vit de façon solitaire. Pourtant, seule l'abeille domestique élevée pour son miel est connue de tous. De par son rapport privilégié avec l'homme - récolte du miel, fascination face au travail acharné des ouvrières - ; l'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) a pendant longtemps été le seul modèle à la base des recherches entomologiques. Au cœur de l'entomologie et de l'apiculture, elle a toujours occupé le sommet de l'arbre phylogénique et ce, malgré les changements successifs de classification (Michez, 2007).

Cependant, d'autres hypothèses ont peu à peu émergé remettant en question la suprématie évolutive de l'abeille mellifère (Rozen & McGinley, 1974 ; Michener & Greenberg, 1980 ; Michener, 1981 ; Alexander, 1992 ; Roig-Alsina & Michener, 1993 ; Radchenko & Pesenko, 1994 ; Alexander & Michener, 1995). Des études fines de la structure de la glose (phylogénie morphologique) ainsi que l'apport de nouveaux outils moléculaires (phylogénie moléculaire) ont permis de lever l'ambiguïté et de quitter cette vision « apidocentrique » en reléguant l'abeille mellifère sur une branche parallèle de l'arbre évolutif (Danforth *et al.*, 2006a, b). Parallèlement, les abeilles à langue courte - rassemblant majoritairement des espèces solitaires - prennent le pas, révolutionnant la conception de l'évolution des abeilles. Malgré tout, elles restent très peu connues du grand public qui maintient une vision « apidocentrique » du monde des apoïdes apiformes.

Ces espèces solitaires présentent un grand intérêt scientifique ; principalement dans la compréhension des mécanismes régissant les interactions plantes-insectes. En particulier, les études sur la physiologie stéroïdique des abeilles sauvages se font rares. Pourtant, elle constitue un élément clef afin d'identifier les facteurs diététiques qui dirigent la spécialisation alimentaire des abeilles.

1.1. Ecologie des abeilles solitaires

1.1.1. Systématique et phylogénie

Actuellement, le nombre d'espèces d'abeilles dans le monde est estimé à environ 20 000 (dont plus de 16 000 décrites) (Ascher *et al.*, 2009, discoverlife.org). Elles sont regroupées en 443 genres répartis dans 9 familles (Michener, 2007). 85 % de ces espèces sont des abeilles qualifiées de solitaires en raison de leurs mœurs de nidification.

Tout comme les espèces sociales, les abeilles solitaires sont positionnées au sein de la superfamille des Apoïdea appartenant elle-même au groupe des Aculéates, au sous-ordre des Apocrites et à l'ordre des Hyménoptères. Outre les abeilles, la superfamille des Apoïdea inclut également les Sphecidae, guêpes solitaires carnivores. Pour cette raison, il est courant de distinguer les apoïdes apiformes (abeilles) des apoïdes spheciformes (sphecides). Malgré cette proximité phylogénétique, la lignée des spheciformes la plus proche des abeilles demeure inconnue (Alexander, 1992 ; Brothers & Carpenter, 1993). Comme en témoignent les nombreux caractères dérivés qu'elles ont en commun, les abeilles constituent un groupe monophylétique (*Fig.1*) (Alexander, 1992 ; Michener *et al.*, 1994).

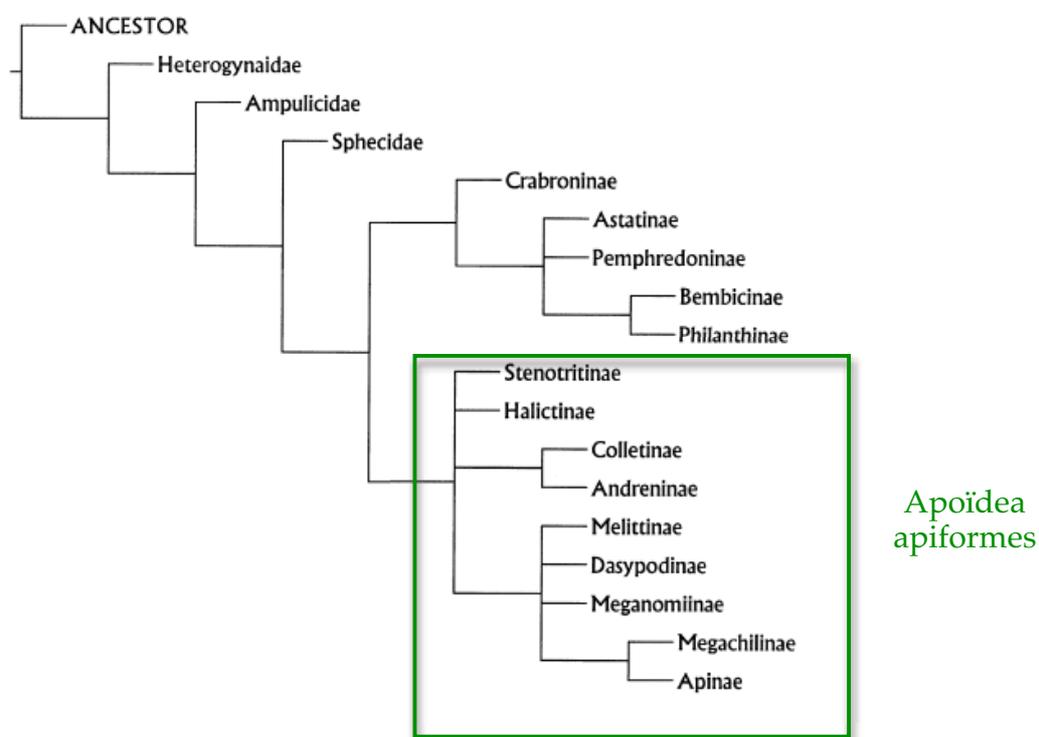


Figure 1: Cladogramme des Apoïdea (d'après Brothers, 1998) mettant en évidence la monophylie des Apoïdea apiformes (cadre).

Sur base de la morphologie de leurs pièces buccales, les apoïdes apiformes sont séparés en deux groupes distincts : les langues courtes (Colletidae, Andrenidae, Halictidae, Melittidae, Meganomiidae, Stenotritidae et Dasypodaïdae) et les langues longues (Megachilidae et Apidae) (Fig.2).

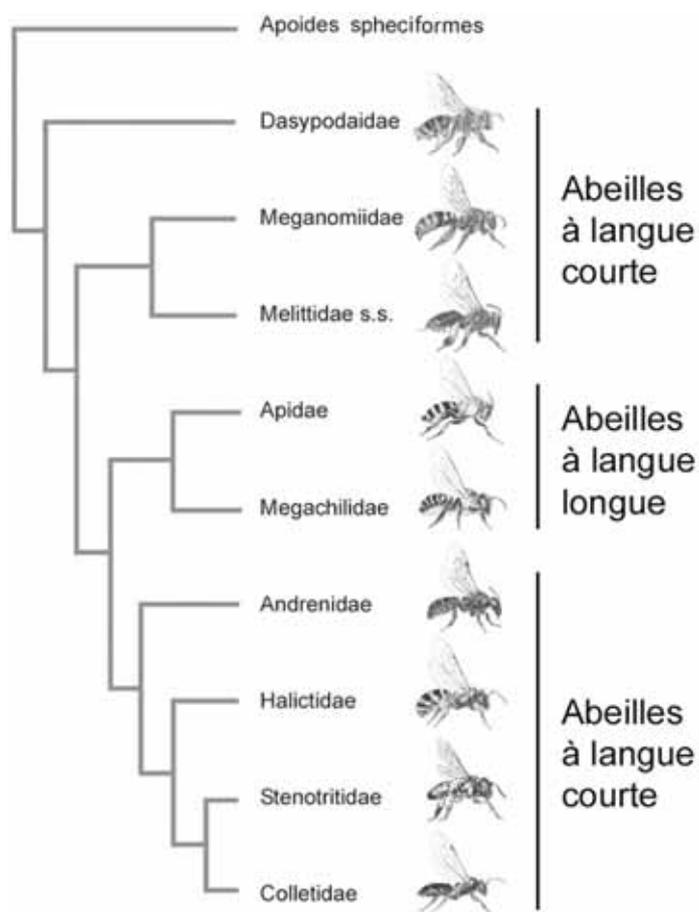


Figure 2: Cladogramme des Apoïdea distinguant les clades à langue longue de ceux à langue courte (d'après Danforth et al., 2006 et Michez, 2007).

1.1.2. Répartition géographique et centre de diversité

Bien que les études faunistiques soient limitées et idiosyncratiques, elles montrent que les abeilles abondent dans la plupart des habitats de tous les continents, excepté l'Antarctique (Michener, 1979 ; Roubik, 1989 ; Neff & Simpson, 1993). Pourvu que les plantes à fleurs soient présentes et que des conditions adéquates pour la nidification soient observées, les abeilles se rencontrent donc du cercle arctique à la Tasmanie.

Bien que la plus grande diversité en genres d'apoïdes apiformes soit observée dans la région néotropicale, le plus grand éventail d'espèces se rencontre dans les régions xériques et tempérées (Michener, 1979 ; Roubik, 1992 ; Ayala *et al.*, 1993). L'abondance d'abeilles solitaires la plus impressionnante s'observe dans les parts du monde chaudes et arides présentant un caractère semi-désertique ; plus particulièrement dans l'Ouest de l'Amérique du Nord, au Turkestan ainsi qu'au sein des régions adjacentes, dans le bassin méditerranéen, dans des parties de l'Afrique du Sud, en Australie et dans l'Ouest de l'Amérique du Sud (Malyshev, 1936 ; Michener, 1940).

1.1.3. Histoire naturelle

Afin de protéger leur progéniture, les abeilles solitaires édifient d'innombrables types de construction (Fig.3, 4, 5 et 6). Certaines abeilles creusent leurs nids dans le sol (Fig.3), dans des tiges de plante (Fig.4), dans du bois mort voire pourri (Fig.5) ou même sur le grès. D'autres construisent leurs nids à partir de feuilles ou de mortier (mélange de terre ou de sable et de salive) dans des cavités appropriées et habituellement préexistantes telles que des coquilles d'escargot (Fig.6) ou des terriers creusés par d'autres insectes xylophages (Malyshev, 1968 ; Stephen *et al.*, 1969 ; Iwata, 1976 ; Roubik, 1989 ; O'Toole & Raw, 1991 ; Pouvreau, 2004). Les nids comportent une ou plusieurs petites loges qui forment autant de cellules individuelles pour le couvain. Ces cellules larvaires peuvent être soit distribuées d'un bout à l'autre d'une galerie ramifiée (Fig.3) soit disposées les unes à la suite des autres (Fig.3) soit agglomérées toutes ensemble (Wcislo & Cane, 1996 ; Pouvreau, 2004). Les parois de ces cellules ou parfois même les pains de pollen sont habituellement tapissés par les femelles à l'aide d'une sécrétion hydrophobe issue de leur glande de Dufour (Duffield *et al.*, 1984 ; Hefetz, 1987).

La plupart des femelles d'abeilles solitaires approvisionnent les cellules en une sorte de pâte nourricière, alimentation des larves, constituée d'un mélange de pollen et de nectar collectés sur les fleurs du site de nidification (Simpson & Neff, 1987), parfois supplémenté par des sécrétions glandulaires (Duffield *et al.*, 1984 ; Houston, 1991a). La femelle pond un œuf sur, dans ou, plus rarement, sous le pain de pollen et scelle la cellule.

Les patterns de diapause ne sont pas encore bien documentés. La plupart des espèces d'abeilles des régions tempérées passent la période défavorable sous forme immature, habituellement au stade de prépupe (ou stade « postdefecating »). D'autres entrent en diapause au stade adulte (Neff & Simpson, 1993 ; Wcislo & Cane, 1996). Généralement, les femelles meurent avant que leur progéniture ne parvienne à l'état adulte. Il n'y a pas de communication entre les générations mis à part chez quelques exceptions telles que *Halictus quadricinctus* et *Lasioglossum marginatum* qualifiées de ce fait d'espèces subsociales (Pouvreau, 2004).

Beaucoup d'abeilles solitaires arborent des préférences en terme de site de nidification et choisissent souvent des sites à proximité de ressources florales (Linsley, 1958 ; Stephen *et al.*, 1969 ; Plateaux-Quénu, 1972 ; Linsley *et al.*, 1980 ; Frankie *et al.*, 1993). Un certain nombre de genres d'abeilles solitaires creusent leurs nids à proximité les uns des autres, formant des agglomérations pouvant être temporaires ou permanentes. Ces agglomérations s'observent lorsque les conditions favorables à la nidification sont concentrées sur une petite surface (Pouvreau, 2004).

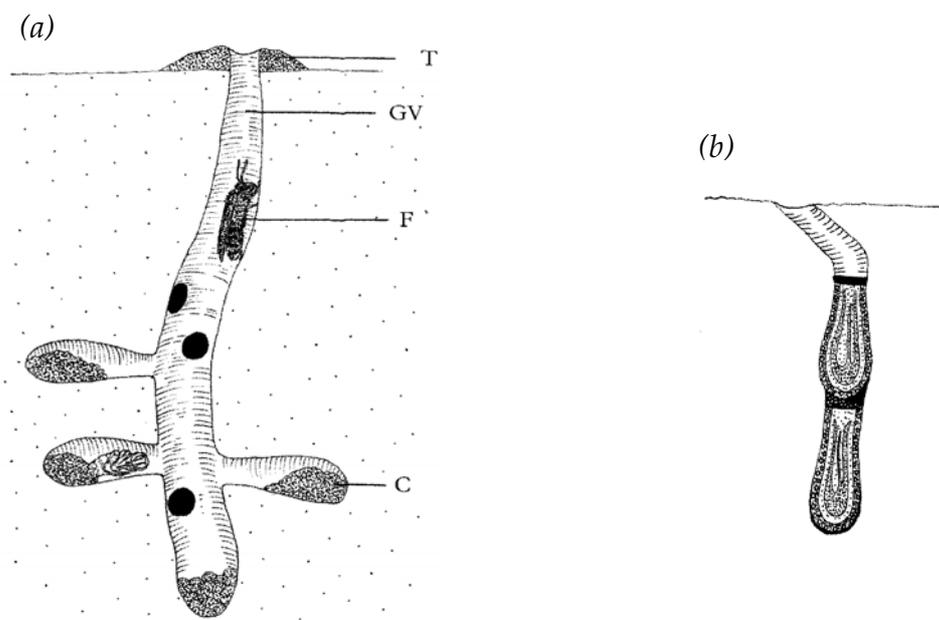


Figure 3 : (a) Nid d'halicte (*Halictus maculatus*, Halictidés). C : cellule ; F : femelle d'halicte ; GV : galerie verticale ; T : tumulus. (b) Nid terricole d'*Anthocopa cristatula* (Osmiini, Mégachilidés) (d'après Pouvreau, 2004).

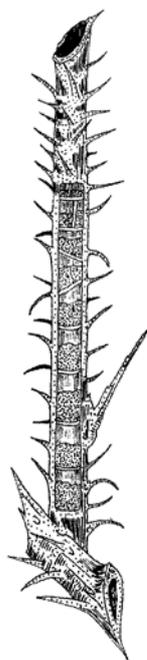


Figure 4 : Nid rubicole d'*Anthocopa ligurica* (Osmiini, Mégachilidés) (d'après Pouvreau, 2004).

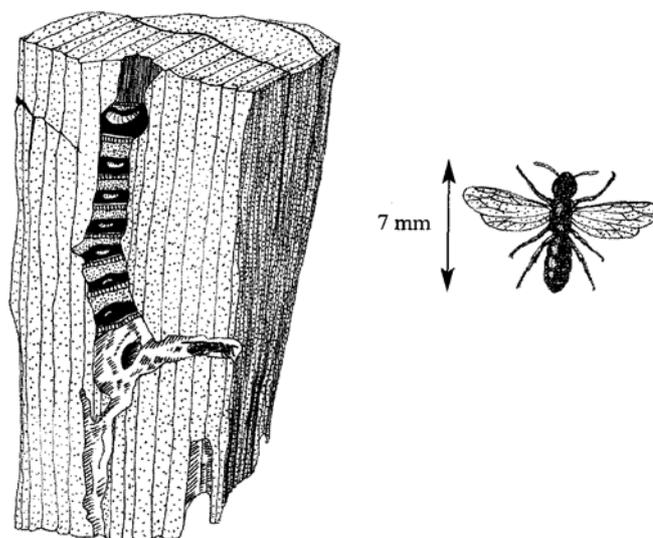


Figure 5 : Nid d'*Heriades* sp. (Mégachilidés) dans un morceau de bois.

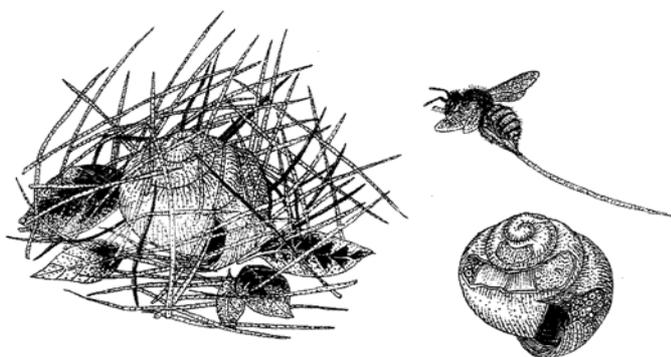


Figure 6 : Nid d'osmie (*Osmia bicolor*, Mégachilidés) dans une coquille d'escargot dissimulée sous des brindilles sèches (d'après Pouvreau, 2004).

1.2. Relation entre plantes et abeilles (Hymenoptera, Apoidea)

« *Specialization in interactions with other species is the root cause of why the world has millions of species rather than thousands.* »

Thompson, extrait de *The co evolutionary process* (1994)

Avec 250 000 à 260 000 espèces décrites, les Angiospermes représentent le groupe de plantes vascularisées le plus diversifié et le plus étendu sur terre (Soltis & Soltis, 2004). Ce succès évolutif trouve probablement son origine en grande partie au sein des nombreuses interactions plantes-insectes, clef de voûte des écosystèmes actuels. Ces interactions peuvent être de plusieurs types: antagonistes dans le cas d'insectes phytophages ; mutualistes dans le cas d'insectes pollinisateurs (Herrera & Pellmyr, 2002).

Pour leur pollinisation, la grande majorité des plantes à fleurs dépend de quatre ordres d'insectes : les Hyménoptères, les Lépidoptères, les Diptères et les Coléoptères (Waser & Ollerton, 2006). Ces interactions ont façonné l'évolution couplée des Angiospermes et de leurs pollinisateurs dès l'émergence des plantes à fleurs au début du Crétacé (Grimaldi, 1999 ; Soltis *et al.*, 2005 ; Grimaldi & Engel, 2005). Parmi tous les groupes d'insectes pollinisateurs, les abeilles constituent le groupe le plus intimement lié aux Angiospermes car elles se nourrissent de leur pollen et de leur nectar à la fois sous forme larvaire et imaginaire. Au cours de leurs visites florales, les femelles d'abeilles transfèrent des grains de pollen d'une fleur à l'autre. Par cette activité, les abeilles participent à la pollinisation et donc à la reproduction de près de 80% des Angiospermes y compris un grand nombre de cultures telles que les tomates, courgettes, fraises et autres arbres fruitiers (Buchmann & Nabhan, 1996). Malgré ce rôle clef, les interactions plantes-abeilles et la compréhension des mécanismes qui les régissent demeurent encore extrêmement fragmentaires.

La récolte de pollen est une activité mécaniquement complexe qui nécessite une certaine habileté des pattes postérieures, variable d'une espèce à l'autre (Westerkamp & Claßen-Bockhoff, 2007). Différentes stratégies de butinage peuvent être observées chez les abeilles. Certaines espèces arborent une spécialisation dans leur choix de pollen, visitant un nombre restreint de plantes disponibles dans leur habitat (monolectisme, oligolectisme) tandis que d'autres butinent un plus large éventail de plantes hôtes (mésolectisme, polylectisme) pouvant cependant arborer une certaine constance (Robertson, 1925 ; Westrich 1989 ; Müller, 1996a ; Cane & Sipes, 2006). Ces interactions plantes-abeilles ont déjà fait couler beaucoup d'encre et ont été le centre de nombreuses discussions. Divers auteurs ont ainsi tenté de classifier les différents types d'exploitation des ressources alimentaires observés au

sein des Apoidea Apiformes (Robertson, 1925 ; Rasmont, 1988 ; Cane & Sipes, 2006 ; Müller & Kuhlmann, 2008). Au cours de ce travail, les qualificatifs relatifs au degré de spécialisation feront référence à la classification proposée par Müller & Kuhlmann (2008) (Tab.1).

Table 1 : Catégories selon la gamme de plantes butinées par l'abeille utilisées dans l'étude de Müller & Kuhlmann (2008). *s.l.* = *sensu lato*, *s.s.* = *sensu stricto*.

Catégorie	Sous catégories	Définition
Monolectisme	-	Récolte de pollen sur une seule espèce de plante même en présence d'une ou de plusieurs espèces sympatriques du même genre. ¹
Oligolectisme	Oligolectisme strict	Récolte de pollen sur deux à plusieurs espèces appartenant à un genre de plante.
	Oligolectisme large	Récolte de pollen sur deux à plusieurs genres appartenant à une tribu, sous-famille ou famille de plante.
	Oligolectisme éclectique	Récolte de pollen sur deux à quatre genres appartenant à deux ou trois familles de plante.
Polylectisme <i>s.l.</i>	Polylectisme avec forte préférence	Récolte de pollen sur plusieurs familles de plantes, mais un clade de plante (famille, sous-famille, tribu, genre ou espèce) prédomine.
	Mésolectisme	Récolte de pollen sur plus de quatre genres de plantes appartenant à deux ou trois familles de plante.
	Polylectisme <i>s.s.</i>	Récolte de pollen sur différents genres appartenant au moins à quatre familles de plante.

¹ La récolte de pollen sur une seule espèce de plante en l'absence de congénère en floraison est renseignée comme un cas spécial d'oligolectisme strict.

Pour optimiser leur activité de récolte, les abeilles sont généralement spécialisées sur un nombre limité d'espèces végétales (oligolectisme) sur lesquelles elles retournent de manière répétitive (Strickler, 1979 ; Cane & Paye, 1988 ; Lavery & Plowright, 1988 ; Williams, 2003). Ainsi, contrairement aux espèces eusociales (à quelques exceptions près comme *Bombus consobrinus* et *Bombus gerstaeckeri* ; Ponchau *et al.*, 2006), les abeilles solitaires - au cycle de vie plus éphémère - sont le plus souvent oligolectiques. Alors que le polylectisme offre un avantage en réduisant la dépendance des abeilles vis-à-vis d'un nombre limité de pollen hôte (Moldenke, 1975 ; Eickwort & Ginsberg, 1980), les facteurs écologiques et évolutifs favorisant et maintenant l'oligolectisme restent sujet à de nombreuses suppositions, pour la plupart non vérifiées. Outre la traditionnelle hypothèse soutenant que l'oligolectisme réduit la compétition interspécifique pour le pollen (Robertson, 1899, 1925 ; Michener, 1954 ; Linsley, 1958 ; Thorp, 1969 ; Michener 1979), il est admis que les spécialistes collectent le pollen de manière plus rapide et plus efficace que les généralistes. Ainsi, l'oligolectisme offre un avantage en terme de potentiel reproducteur pour l'abeille par approvisionnement d'un plus grand nombre de cellules larvaires par unité de temps (Lovell, 1912, 1913, 1914 ; Heinrich, 1976 ; Williams, 1977 ; Strickler, 1979).

Traditionnellement, l'hypothèse selon laquelle les espèces oligolectiques ont évolué à partir d'ancêtres polylectiques est largement admise (Michener, 1954 ; Linsley, 1958 ; MacSwain *et al.*, 1973 ; Iwata, 1976 ; Moldenke, 1979 ; Hurd *et al.*, 1980). En effet, il existe une série d'exemples indubitables de transitions d'un état polylectique à un état oligolectique. C'est le cas du genre *Lasioglossum* au sein duquel des espèces spécialistes ont évolué deux fois dans des clades de généralistes (Danforth *et al.*, 2003). Cependant, il semble de plus en plus évident que beaucoup d'espèces d'abeilles généralistes dérivent d'ancêtres oligolectiques. Ainsi, les clades à la base de la plupart des familles d'abeilles incluent une grande proportion de butineuses spécialistes (Westrich, 1989 ; Wcislo & Cane, 1996 ; Patiny *et al.*, 2007). Les Dasypodidae et le Mellitidae, familles sœurs de toutes les autres abeilles rassemblant vraisemblablement le plus de caractères ancestraux, comportent essentiellement des espèces présentant des régimes alimentaires spécialisés, suggérant que l'oligolectisme pourrait être l'état ancestral chez les Apoïdes apiformes (Danforth *et al.*, 2006a, b ; Michez *et al.*, 2008b). L'oligolectisme est également supposé être l'état plésiomorphe dans le genre *Andrena* au sein duquel le polylectisme a évolué plusieurs fois indépendamment (Larkin *et al.*, 2008). Par ailleurs, Müller (1996b) ayant décrit dans une étude sur les Anthidine au moins quatre transitions de l'oligolectisme vers le polylectisme mais aucune en sens inverse, le polylectisme semble être un état dérivé dans le cas de plusieurs Anthidiini (Megachilidae).

Plusieurs études récentes associant analyses phylogénétiques et analyses des choix floraux ont démontré que les préférences alimentaires des abeilles se sont sensiblement modifiées au cours de l'évolution (Müller, 1996b; Patiny *et al.*, 2007; Michez *et al.*, 2008b ; Müller & Kuhlmann, 2008). Plusieurs patterns évolutifs ont été décrits. Certaines espèces sœurs optent pour une plante hôte proche d'un point de vue phylogénétique ou morphologique de la plante hôte ancestrale, alors que d'autres espèces s'adaptent à de nouveaux hôtes sans lien apparent avec la plante hôte ancestrale. En outre, dans certains cas la largeur de la niche alimentaire semble conservée (les espèces sœurs restent toutes spécialistes), alors que dans d'autres cas la largeur de la niche change (les espèces sœurs sont respectivement spécialistes et généralistes). Cependant, il a été montré à plusieurs reprises que les spécialisations florales au sein des abeilles sont hautement conservées, avec des espèces sœurs exploitant généralement le même hôte (Müller, 1996b ; Wcislo & Cane, 1996 ; Michez *et al.*, 2004 ; Sipes & Tepedino, 2005 ; Minckley & Roulston, 2006 ; Patiny *et al.*, 2007 ; Larkin *et al.*, 2008 ; Michez *et al.*, 2008b ; Sedivy *et al.*, 2008).

Pour ces espèces oligolectiques, il est primordial que l'émergence des imagos et la période de floraison de leur plante hôte soient synchronisées (Michez *et al.*, 2008a). Tout changement phénologique peut être corrélé avec un changement d'hôte ou un changement au niveau du panel de fleurs visitées (Larkin *et al.*, 2008). En effet, la synchronisation de la floraison et de l'émergence de l'abeille assure à cette dernière la disponibilité des ressources alimentaires. Le pollinisateur oligolectique se doit ainsi de rester en diapause lorsque sa plante hôte n'est pas en fleur (Waser & Ollerton, 2006). Les synchronisations des activités de butinage des insectes oligolectiques avec leur plante hôte sont également observées à échelle journalière (Eickwort & Ginsberg, 1980). Ces relations étroites façonnent la distribution spatiale et temporelle ainsi que l'activité de l'insecte, toutes deux corrélées à la présence et à la phénologie de la plante hôte (rythmes de développement de la fleur) (Pouvreau, 2004). Ainsi, l'abondance relative des espèces oligolectiques semble plus faible sous les tropiques (Heithaus, 1979 ; Michener, 1979 ; Roubik, 1989). Quant aux généralistes, ils prédominent apparemment dans la majeure partie des biômes tempérés, excepté les régions tempérées xériques et à climat méditerranéen (Moldenke, 1979). Cependant, étant donné que la majorité des études n'inclut pas l'analyse palynologique des charges scopales et que les différents auteurs ne s'accordent pas sur les définitions des degrés de spécialisation, aucune conclusion définitive ne peut être tirée (Wcislo & Cane, 1996). L'apparente décroissance latitudinale de l'abondance relative des espèces oligolectiques peut être liée au problème de localisation de ressources spécifiques dans un environnement complexe à la fois d'un point de vue spatial et temporel (Bernays & Wcislo, 1994). En effet, l'imprévisibilité spatiale et temporelle des phénologies florales est substantielle dans les forêts tropicales. La synchronisation entre phénologies plante/insecte est une

condition indispensable aux phénomènes de spécialisation, plus couramment rencontrés dans les forêts sèches où la disponibilité des ressources est plus saisonnière que dans les forêts humides (Bawa, 1990 ; Bronstein, 1995).

Outre ces adaptations phénologiques annuelle et journalière, les femelles d'abeille présentent une large gamme d'adaptations structurelles et comportementales leur permettant de collecter et de transporter le pollen jusqu'à leurs nids. En effet, bien que certaines femelles transportent le pollen à l'intérieur de leur tube digestif (Thorp, 1979), la plupart possèdent des dispositifs externes pour le transport du pollen ainsi que des structures particulières leur permettant de broser leur corps pour accumuler le pollen dans les scopae. Plusieurs études ont montré que les espèces oligolectiques arborent parfois des adaptations morphologiques pour la récolte de pollen (Thorp, 1979, 2000). Ces adaptations morphologiques sont observées chez les abeilles qui récoltent du pollen difficilement accessible (Müller, 2006) ou de grande taille (Pasteels & Pasteels, 1979 ; Thorp, 1979). Ainsi, certaines abeilles possèdent des poils en crochet sur le proboscis ou les pattes antérieures afin de faciliter la récolte de pollen des fleurs aux anthères dissimulées (Shinn, 1967 ; Thorp, 1979 ; Parker & Tepedino, 1982 ; Houston, 1990, 1991b ; Harder & Barrett, 1993 ; Müller, 1995, Thorp, 2000). D'autres espèces présentent une pilosité localement plus abondante, habituellement sur la tête, qui aide à accumuler le pollen floral, en particulier celui provenant des fleurs nototribes (Thorp, 2000). Certaines abeilles arborent des séquences de mouvements particulières telles que la vibration des fleurs (« buzzing ») dans le but d'augmenter la quantité de pollen prélevée, en particulier dans le cas des plantes possédant des anthères à déhiscence poricide (Macior, 1982 ; Buchmann, 1983 ; Houston & Thorp, 1984 ; Gottsberger & Silberbauer-Gottsberger, 1988 ; Neff & Simpson, 1988 ; Proença, 1992 ; Macior, 1995 ; Müller *et al.*, 1997). L'évolution de ces structures et comportements spécialisés dans la collecte du pollen a eu lieu plusieurs fois indépendamment dans des taxa pouvant être phylogénétiquement éloignés. De plus, ces adaptations ne se restreignent pas aux abeilles oligolectiques mais se rencontrent également chez plusieurs espèces polylectiques (Thorp, 2000). Chez la majorité des espèces oligolectiques, la spécialisation est liée à la phénologie particulière des butineuses plutôt qu'à une morphologie particulière (Michez *et al.*, 2008b).

Diverses études menées sur la digestibilité du pollen et le développement larvaire indiquent que les espèces spécialistes digèrent de manière plus efficace le pollen provenant de leur plante hôte habituelle que celui prélevé sur d'autres plantes. Ce phénomène se traduit par un ralentissement de la croissance voire même un échec développemental de la larve croissant sur des types de pollen autres que celui de sa plante hôte (Levin & Haydak, 1957 ; Guirguis & Brindley, 1974 ; Tasei & Masure, 1978 ; Praz *et al.*, 2008). Il semble donc que l'adaptation des oligolectiques se traduise également au niveau physiologique.

De façon comparable aux insectes, les fleurs sont qualifiées d'oligophiles, de polyphiles ou de monophiles selon qu'elles soient visitées et pollinisées par des espèces d'insectes oligolectiques, polylectiques ou monolectiques (Pouvreau, 2004).

Outre son rôle dans l'alimentation des abeilles, le pollen joue un rôle prépondérant dans le processus de reproduction de la plante, servant de vecteur pour l'information génétique mâle. Dans cette optique, les incessants voyages des butineuses sur la même espèce ne confèrent pas uniquement des avantages à l'abeille mais sont un prérequis inévitable pour qu'une pollinisation efficace puisse avoir lieu (Westerkamp & Claßen-Bockhoff, 2007). Cependant, la quantité de pollen prélevée sur la fleur pour la reproduction de l'insecte est énorme (approvisionnement des cellules larvaires). De plus, l'efficacité de récolte est telle que l'abeille est capable de sous-tirer l'entièreté du pollen d'une fleur, ne laissant (quasi) rien pour la pollinisation (Westrich, 1989 ; Müller, 1996b ; Müller *et al.*, 2006 ; Westerkamp & Claßen-Bockhoff, 2007). Par exemple, Schlindwein *et al.* (2005) ont constaté que 95,5% du pollen produit par des fleurs de *Campanula rapunculus* étaient collectés par les abeilles alors que seuls 3,7% contribuaient à la pollinisation. Une autre étude a révélé que parmi 41 espèces d'abeilles étudiées, 85% nécessitaient l'équivalent du contenu pollinique total de plus de 30 fleurs pour approvisionner une seule larve. Le pollen de plus de 1000 fleurs était même requis dans le cas de certaines espèces (Müller *et al.*, 2006). Après chaque visite florale, l'abeille se brosse soigneusement le corps et transfère les grains de pollen dans des brosses de récoltes spécialisées (scopae) les rendant généralement inaccessibles pour la pollinisation (Westerkamp, 1996). Ces énormes quantités de pollen collectées par les abeilles compromettent le succès reproducteur de la plante engendrant une forte compétition entre l'insecte et son hôte pour le pollen. De ce fait, les interactions plantes-insectes ne peuvent être considérées comme un simple mutualisme (Inouye, 1980 ; Westerkamp, 1996, 1997a ; Thorp, 2000 ; Irwin *et al.*, 2001) mais sont plus justement décrites comme une « exploitation mutuelle balancée » (Westerkamp, 1996) où les fleurs doivent continuellement faire face au dilemme d'attirer les abeilles pour la pollinisation, d'une part, et de restreindre les pertes de pollen, d'autre part (Praz *et al.*, 2008).

Les plantes doivent donc minimiser les pertes de pollen en restreignant le spectre des visiteurs palynophages. Plusieurs traits morphologiques floraux sont actuellement interprétés comme des adaptations contre une exploitation excessive du pollen par les abeilles :

(i) hétéranthérie,

« [Regarding plants] with two kinds of anthers...I am very low about them, and have wasted enormous labour over them, and cannot yet get a glimpse of the meaning of the parts. »

C. Darwin à J. D. Hooker, 14 Octobre 1862

« I have had a letter from Fritz Müller suggesting a novel and very curious explanation of certain plants producing two sets of anthers of different colour. This has set me on fire to renew the laborious experiments which I made on this subject, now 20 years ago. »

C. Darwin à W. Thiselton-Dyer, 21 Mars 1881

Comme le montrent ces extraits épistolaires, l'observation de l'hétéranthérie n'est pas récente. La production de deux ou de plusieurs types d'étamines par chacune des fleurs réduit le conflit plante-abeille en permettant la spécialisation d'anthères différentes dans une fonction de pollinisation et d'alimentation: les anthères plus discrètes produisent du pollen assurant la fertilisation tandis que le pollen destiné aux abeilles est fourni par des anthères plus visibles (Vogel, 1993);

(ii) la dissimulation des anthères dans :

- fleurs nototribes telles que les Lamiaceae et Scrophulariaceae, où les anthères sont placées sous la lèvre supérieure, entrant en contact avec la surface dorsale des butineuses. Ce type de fleurs ne peut être exploité que par des abeilles possédant soit des poils spécialisés dans la récolte du pollen sur la tête et le thorax, soit des adaptations comportementales (Müller, 1996a ; Houston, 2000 ; Thorp, 2000),
- des tubes floraux étroits tels que pour la plupart des Boraginaceae, Primulaceae ou pour le *Muscari* (Hyacinthaceae). A nouveau, leurs butineuses sont pourvues de poils modifiés au niveau du proboscis et des pattes antérieures (Thorp, 1979, 2000 ; Parker & Tepedino, 1982 ; Müller, 1995; Müller & Kuhlmann, 2003 ; Neff, 2004 ; Müller, 2006),

- des fleurs sténotribes carénées telles que les Fabaceae. Leur corolle se compose d'un étendard (pétale supérieur); de deux ailes (pétales latéraux) ainsi que d'une carène (coque formée des deux pétales inférieurs recourbés et rapprochés voire soudés) au sein de laquelle sont complètement englobées les anthères (Fig.7).

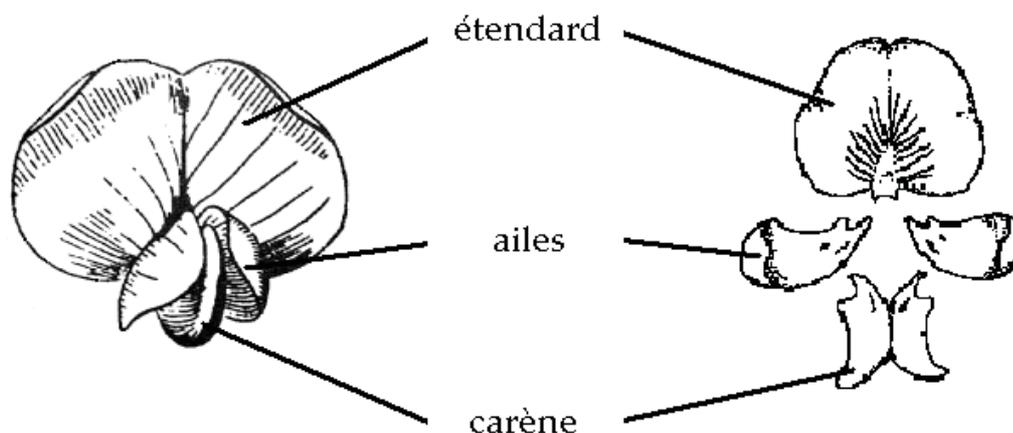


Figure 7: Schéma d'une fleur papilionacée (Fabaceae). A gauche, vue générale de face montrant les positions relatives de l'étendard, des ailes et de la carène; à droite, schéma de la corolle éclatée.

L'exploitation de ces fleurs papilionacées est limitée aux abeilles capables d'abaisser le complexe ailes-carène de la fleur à l'aide de leurs pattes et de rendre ainsi accessible le pollen ou les structures porteuses de pollen (Westerkamp, 1997b) ;

- (iii) la dissimulation du pollen dans des anthères poricides le rendant uniquement accessible aux espèces capables de faire vibrer la fleur par « buzzing » (Buchmann, 1983 ; Harder & Barclay, 1994) ;
- (iv) la libération progressive de pollen forçant le pollinisateur à visiter les fleurs de manière répétitive (Erbar & Leins, 1995 ; Schlindwein *et al.*, 2005).

Toutes ces fleurs hautement spécialisées dans leurs interactions avec leurs pollinisateurs sont mécaniquement complexes et leur exploitation par les abeilles requiert une certaine force et un mouvement coordonné de nombreux organes de l'insecte. Leur accès est donc limité à une guilda de pollinisateurs spécialisés et fidèles (Westerkamp, 1997a).

A côté de toutes ces adaptations morphologiques, la sélection peut aussi agir sur la composition chimique du pollen, que ce soit sur sa toxicité ou sur sa valeur nutritionnelle, afin d'empêcher une récolte excessive par les abeilles (Praz *et al.*, 2008):

- Jürgens & Dötterl (2004) ont montré que la plupart des espèces de Ranunculaceae contiennent de la protoanémone, toxique pour les vertébrés et présentant des propriétés insecticides et antimicrobiennes. Chez *Ranunculus acris*, cette toxine est le volatile le plus abondant dans le pollen mais est proportionnellement moins représentée dans les autres parties florales (Bergström *et al.*, 1995). L'hypothèse que cette concentration élevée en protoanémone pourrait limiter la récolte de pollen est renforcée par les résultats de Praz *et al.* (2008) démontrant la toxicité du pollen de *Ranunculus* pour les espèces non-spécialisées sur ce genre (Jürgens & Dötterl, 2004).
- Le pollen peut également être protégé chimiquement par une carence en nutriments essentiels tels que les stérols dans le cas d'*Arbustus unedo* dont l'abeille mellifère consomme le nectar mais pas le pollen (Rasmont *et al.*, 2005). De même, une diète à base de pollen de *Taraxacum officinale* ne convient ni aux adultes ni aux larves d'*Apis mellifera* de par les insuffisances en plusieurs acides aminés essentiels (Herbert *et al.*, 1970 ; Roulston & Cane, 2000). Par ailleurs, quelques études ont montré que des larves ne pouvaient pas se développer sur certains types de pollen (Levin & Haydak, 1957; Praz *et al.*, 2008). Certaines plantes ne sont donc pas adéquates pour le développement et la survie de certaines espèces d'abeilles.

Toutes ces études laissent à penser que ce n'est pas l'insecte qui choisit sa plante hôte mais la plante qui choisit son pollinisateur, régissant les interactions plantes-abeilles. Par ailleurs, les résultats de l'étude menée par Praz *et al.* (2008) suggèrent que la qualité nutritive ou les propriétés de protection du pollen peuvent constituer une contrainte prévenant le polylectisme, remettant en question l'hypothèse que les spécialisations florales chez les abeilles ne sont pas liées à la composition chimique du pollen (Wcislo & Cane, 1996 ; Minckley & Roulston, 2006).

1.3. Métabolisme stéroïdique

1.3.1. Les stérols

Les stérols sont des stéroïdes se caractérisant par la présence d'un groupe hydroxyl -OH sur le carbone C₃ et d'une chaîne aliphatique de 8 à 10 carbones greffée au carbone 17. Il s'agit de lipides insaponifiables dont la structure de base est composée de trois cycles à 6 carbones et d'un cycle à 5 carbones, contenant un total de 17 atomes de carbone. Ce noyau tétracyclique hydrocarboné est connu sous le nom de cyclopentanoperhydrophénanthrène dont les cycles sont désignés par les lettres A, B, C et D. La plupart des stéroïdes possèdent deux groupes méthyles liés aux carbones 10 et 13 (Fig.8). Les stérols diffèrent entre eux par le nombre et la position des doubles liaisons; le type, le nombre et la localisation de groupes fonctionnels; la configuration des substituants (α ou β) et la conformation des cycles (Roberts & Caiserio, 1977 ; Lehninger, 1981 ; Behmer & Nes, 2003).

Les stérols sont des constituants des matières grasses animales (principalement le cholestérol, Fig.8) et végétales (phytostérols) assurant de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques (section 1.3.3.).

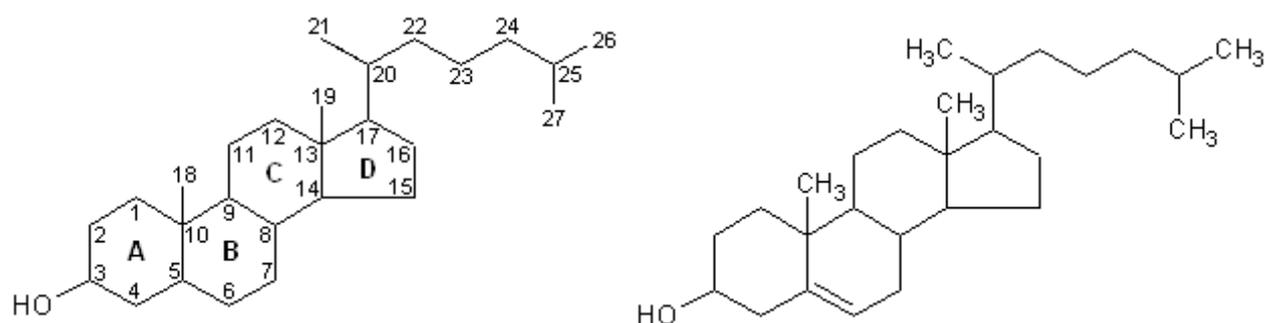


Figure 8: A gauche, structure principale des stérols. Les atomes de carbones sont numérotés. A droite, structure du cholestérol, stérol typique du règne animal.

1.3.2. Les phytostérols

Si le cholestérol est le stérol le plus abondant dans les tissus animaux; dans le règne végétal, ce sont les phytostérols qui sont les plus représentés. En effet, très peu de plantes synthétisent du cholestérol. Par rapport au cholestérol ($C_{27}H_{45}OH$), les phytostérols présentent un ou deux substituants carbonés supplémentaires au niveau du carbone 24. Actuellement, au moins cent stérols différents ont été identifiés dans les plantes dont les plus courants sont le β -sitostérol, le 24-méthylènecholestérol et le campestérol (Kritchevsky, 1963; Akihisa *et al.*, 1991) (Fig.9). Les phytostérols diffèrent entre eux principalement par le nombre et la position des insaturations au sein du noyau et de la chaîne latérale ainsi que par l'ampleur du groupement alkyl en C_{24} (Behmer & Nes, 2003). Concernant les différences entre chaînes latérales stéroliques, la taille du groupement 24-alkyl et sa direction (orientation α ou β) reflètent tous deux les différences phylogénétiques ayant eu lieu durant l'évolution des plantes. Ainsi, les organismes primitifs possèdent une chaîne latérale de type ergostérol tandis qu'une chaîne latérale de type stigmastérol caractérise les organismes dérivés (Nes & McKean, 1977).

De nombreuses études ont été menées afin d'établir les différents profils stéroliques caractéristiques des plantes (Bergmann, 1957 ; Nes & Nes, 1980 ; Akihisa *et al.*, 1987 ; Chiu *et al.*, 1988 ; Salt *et al.*, 1991 ; Patterson, 1994 ; Svoboda *et al.*, 1995 ; Schiff & Feldlaufer, 1996). De l'ensemble de ces études, il ressort que la plupart des plantes contiennent plusieurs stérols qui varient les uns des autres tout en restant dans la même catégorie générale. Un cas extrême de variation structurelle intraspécifique est observée chez le maïs caractérisé par un groupement 24-alkyl oléfine mais pouvant synthétiser plus de 60 stérols différents (Guo *et al.*, 1995). Par ailleurs, il semble y avoir un modèle phylogénétique sous-jacent déterminant la structure du noyau stérolique. Cependant, peu de preuves ont été avancées pour affirmer que la taxonomie peut être utilisée afin prédire le profil stérolique des différents types de pollen; et ce, particulièrement depuis que trois espèces appartenant à la famille des Salicaceae se sont révélées extrêmement variables dans leurs contenus stéroliques en C_{27} , C_{28} et C_{29} (Standifer *et al.*, 1968).

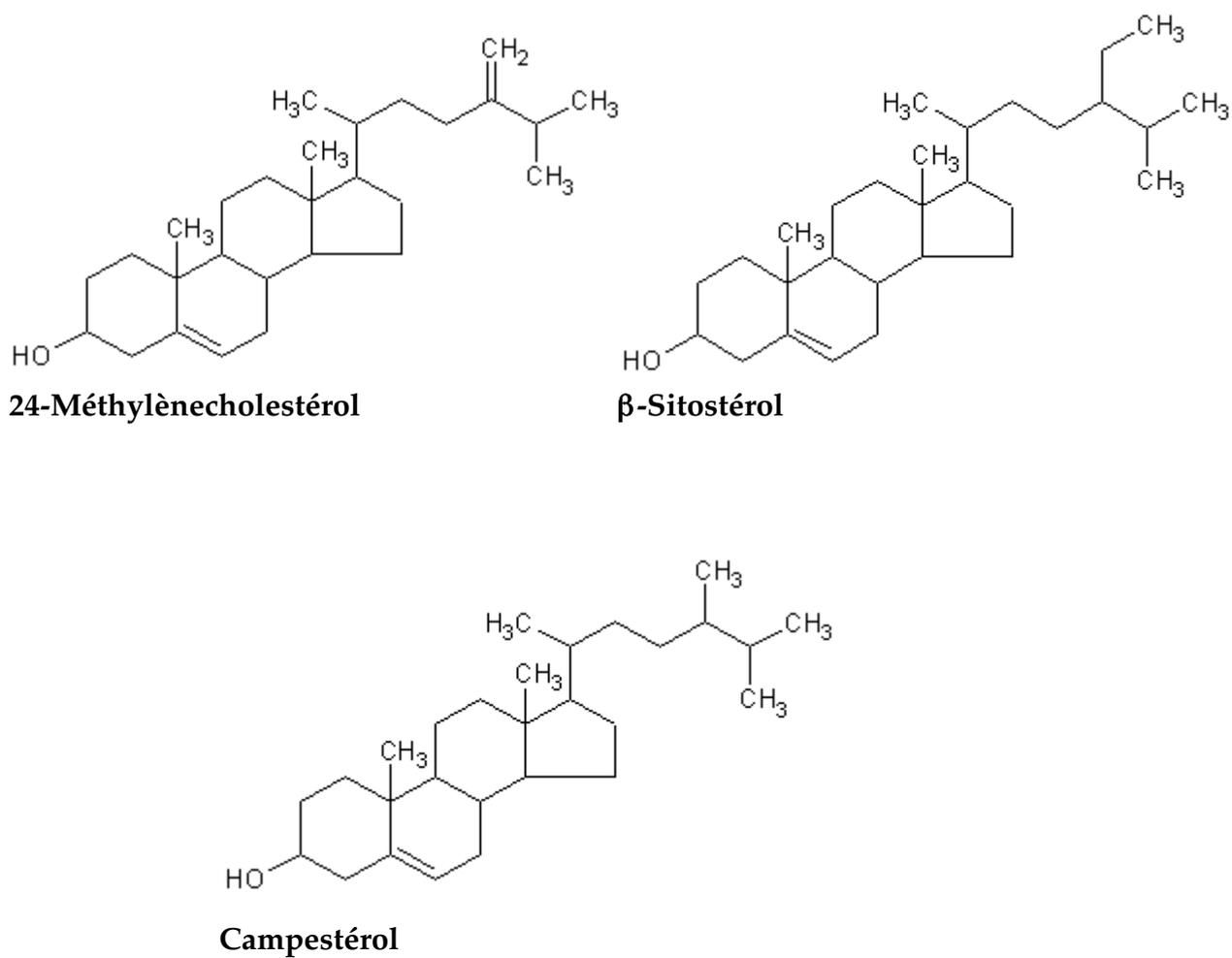


Figure 9 : Structure du 24-méthylènecholestérol (stérol à 28 carbones), du β-sitostérol (stérol à 29 carbones) et du campesterol (stérol à 28 carbones) ; stérols typiques du règne végétal (phytostérols).

1.3.3. Etat actuel des connaissances

Les arthropodes constituent le plus grand embranchement du règne animal. La composition en stérols ainsi que le métabolisme stéroïdique ont été largement étudiés dans ce groupe.

Il est généralement admis que les insectes, à la différence des vertébrés et des plantes, sont incapables de synthétiser des stérols et plus particulièrement pas de cholestérol. Les stérols ne peuvent donc être assimilés que par l'alimentation (source exogène). Par leur implication au sein de nombreuses fonctions endogènes telles que la mue et la maturation des ovarioles, les stérols sont indispensables pour l'accomplissement du cycle de vie des insectes et constituent de ce fait un élément essentiel de leur diète. À l'heure actuelle, il est admis que les stérols jouent trois rôles dans la physiologie des insectes (Fig.10) : (i) comme composant essentiel des membranes cellulaires et tissus nerveux; (ii) comme un précurseur de l'hormone de mue, ecdystéroïdes, et (iii) comme une molécule de signalisation se liant au groupe de protéines *Hedgehog* qui conditionnent le développement (Behmer & Nes, 2003). Toute carence peut donc leur être fatale.

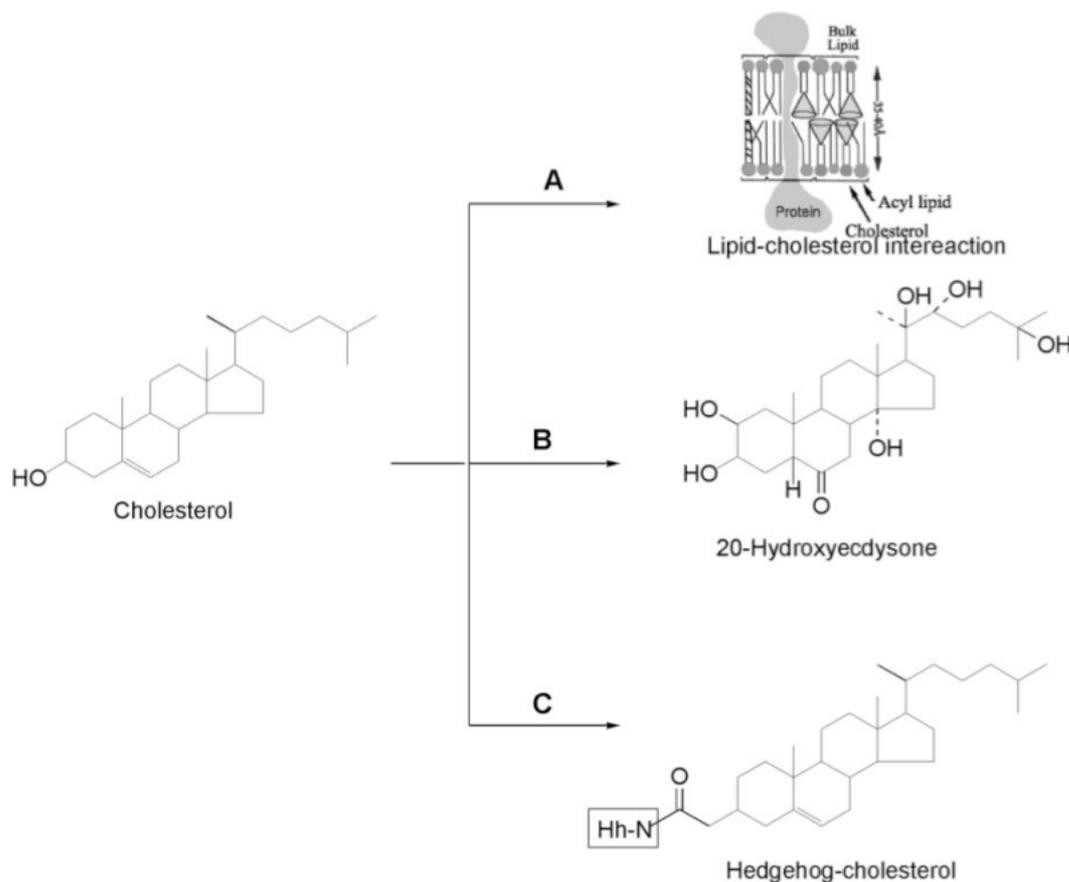


Figure 10: Rôles du cholestérol. Diagramme représentant les fonctions du cholestérol - (A) composant membranaire, (B) précurseur de l'hormone de mue 20-hydroxyecdysone et (C) comme une molécule intervenant dans la voie de signalisation Hedgehog (d'après Behmer & Nes, 2003).

Bien que seuls 9 des 29 ordres d'insectes (Collembola, Orthoptera, Phasmida, Thysanoptera, Hemiptera, Coleoptera, Lepidoptera, Diptera et Hymenoptera) arborent un régime herbivore, près de la moitié de toutes les espèces d'insectes décrites occupent cette niche alimentaire (Strong *et al.*, 1984). Les insectes phytophages se rencontrent sur toutes les espèces végétales; se nourrissant d'une large gamme de parties et de tissus floraux, y compris les feuilles, les tiges, le bois, les racines, les bourgeons, les fleurs, les fruits, le pollen, le nectar, le xylème et le phloème.

Probablement originaires du Crétacé (Danforth *et al.*, 2004), les abeilles partagent une longue histoire évolutive avec les Angiospermes (Praz *et al.*, 2008). Issues d'un groupe de guêpes (Apoidea, Sphéciformes), elles ont substitué à un régime carnassier un régime entièrement phytophage principalement basé sur la récolte de pollen des plantes (Danforth *et al.*, 2006). En général, le pollen de la plupart des espèces végétales accumule des composés stéroliques tels que les 24 - méthylénestérols et 9 β ,19-cyclopropyl stérols (Nes & Schmidt, 1988; Lusby *et al.*, 1993). Cependant, le sitostérol ou le stigmastérol peuvent parfois constituer le stérol majeur du profil stérolique palynologique (Standifer *et al.*, 1968).

Parmi les insectes phytophages, le cholestérol tend à représenter le stérol tissulaire majeur, bien que les phytostérols soient souvent présents, parfois même en grandes quantités (Behmer & Nes, 2003). Si les proies des insectes carnivores contiennent du cholestérol ; chez les végétaux, pauvres ou dépourvus de cholestérol, ce sont les phytostérols qui sont les stérols les plus abondants. Pour pallier à ce problème, les insectes ont développé diverses adaptations :

- assurer leurs besoins en stérols par le biais de micro-organismes qu'ils renferment ou avec lesquels ils vivent en association (Clayton, 1964) ;
- métaboliser et convertir les phytostérols en cholestérol par le biais de voies de désalkylation (Fig.11) (Herbert *et al.*, 1980 ; Svoboda *et al.*, 1980 ; Herbert *et al.*, 1981) ;
- utiliser d'autres stérols que le cholestérol comme précurseur de leur hormone de mue (Herbert & Shimanuki, 1978).

Chez les Hyménoptères, il semble que la capacité de désalkylation soit présente chez les membres "primitifs" mais perdue chez les membres "dérivés" (Schaefer *et al.*, 1965; Behmer & Nes, 2003). Parmi les fourmis qui entretiennent des jardins fongiques (*Acromyrmex octospinosus* (Reich)), la composition stérolique de l'insecte reflète généralement celle du champignon, indiquant que peu de métabolisme stérolique survient (Maurer *et al.*, 1992). Enfin, parmi les abeilles (*Apis mellifera* L.), le 24-méthylènecholestérol est le stérol tissulaire dominant, suivi par d'autres phytostérols déterminés par la composition stérolique des plantes hôtes apicoles. Indépendamment des stérols disponibles dans la diète des ouvrières, le 24-méthylènecholestérol est le stérol majeur du couvain dont elles s'occupent (Svoboda

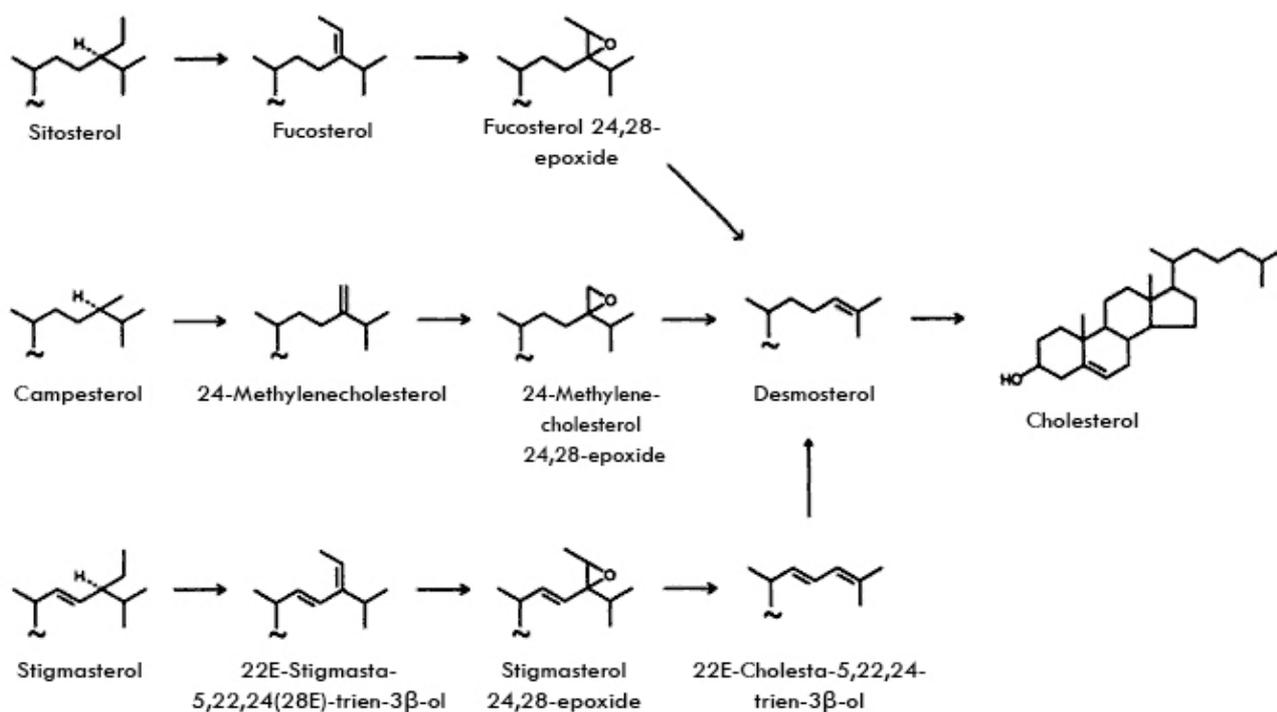


Figure 11 : Schéma général de la désalkylation et de la conversion du sitostérol, campestérol et stigmastérol en cholestérol chez les insectes phytophages (Svoboda et al., 1991). Il existe plusieurs voies possibles de métabolisation des phytostérols en cholestérol suivant les insectes. Elles sont le siège de différentes réactions chimiques visant toutes à la formation du précurseur des hormones de mue, le cholestérol. Ainsi, les stérols sont tour à tour oxydés (sitostérol-fucostérol), réduits (desmostérol-cholestérol), hydroxylés (cholestérol-ecdysone) et désalkylés (campestérol (C28) – cholestérol (C27)) (Regali, 1996).

et al., 1983). Ce phénomène résulte d'un transfert sélectif de quantités importantes de 24-méthylènecholestérol du stock stérolique endogène des ouvrières aux larves (Svoboda *et al.*, 1986). Hormis *Megachile rotundata* (Svoboda & Lusby, 1986) et *Diadasia rinconis* (Feldlaufer *et al.*, 1993), aucune étude n'a été menée sur les profils stéroliques des abeilles solitaires. Ces deux espèces sont incapables de désalkyler les phytostérols en cholestérol. Leurs stérols tissulaires majeurs sont le Δ^5 -avénastérol (40,7 %) et le 24-méthylènecholestérol (34,1 %) concernant *M. rotundata* et le 24-méthylènecholestérol (92,2 %) dans le cas de *D. rinconis*.

Un autre aspect important est la relation qui pourrait lier le métabolisme stérolique d'un insecte à son écologie. Il semble fort peu probable que les exigences stéroliques influent sur le comportement alimentaire sélectif des insectes carnivores pour qui le cholestérol n'est probablement jamais un élément limitant. De même, les insectes phytophages spécialistes devraient, par définition, être spécifiquement adaptés aux profils stéroliques, aux concentrations et aux distributions spatiales des stérols de leurs plantes hôtes. C'est par exemple le cas de certains espèces cactophiles de *Drosophila* (Fogleman *et al.*, 1986). Par contre, les contraintes métaboliques stéroliques pourraient être un facteur déterminant dirigeant le comportement alimentaire des insectes herbivores généralistes (Bernays, 1992; Behmer & Elias, 2000). Diverses communautés végétales offrent un large éventail de stérols alimentaires, mais la signification fonctionnelle de cette variation des profils stéroliques végétaux reste un mystère. Une possibilité est que les profils stéroliques pourraient refléter des adaptations face à des conditions abiotiques locales (Xu *et al.*, 1988 ; Heywood, 1993). Il est également possible que le profil phytostérolique joue un rôle de défense unique contre les insectes herbivores. Le fait que les phytostérols puissent avoir un rôle de défense est renforcé par la constatation que les sauterelles ont des réponses comportementales très sensibles, incluant l'apprentissage par rapport aux profils stéroliques (Champagne & Bernays, 1991 ; Behmer & Elias, 1999 ; Behmer *et al.*, 1999a).

Traditionnellement, les termes « spécialiste » et « généraliste » se réfèrent à la gamme d'hôtes d'un insecte herbivore. Cependant, ils pourraient également être utilisés pour qualifier les capacités d'un insecte à métaboliser les stérols. Toutefois, les gammes d'hôtes et de stérols exploités par un insecte ne sont pas toujours corrélées. Ainsi, la chenille du Sphingidae *Manduca sexta* est spécialisée sur les Solanaceae mais est capable de croître sur un large éventail de stérols (Svoboda & Robbins, 1968). A l'inverse, les sauterelles sont des herbivores généralistes mais sont spécialistes en terme de stérols, le sitostérol étant le seul phytostérol qu'elles sont capables de convertir en cholestérol (Behmer *et al.*, 1999b).

Les études explorant la manière dont la physiologie stérolique des insectes interagit avec leur écologie prennent actuellement leur essor. Cependant, il est prouvé que de telles interactions pourraient jouer un rôle dans la modification

comportementale, en particulier dans la sélection alimentaire des insectes phytophages. Par exemple, quelle est l'importance des phytostérols dans la détermination des patterns d'alimentation chez les insectes phytophages généralistes? Dans quelle mesure les insectes généralistes présentant des contraintes métaboliques doivent-ils limiter leur consommation en phytostérols inadaptés, et quels sont les taux tolérables? Les stérols sont-ils limitants pour les insectes phytophages en cours de développement ou de reproduction? Une meilleure compréhension de la relation entre les stérols et les insectes pourrait peut-être apporter un éclairage nouveau sur la manière dont les interactions plantes-insectes sont façonnées (Behmer & Nes, 2003).

Ainsi, le comportement alimentaire des abeilles pourrait être orchestré par les profils stéroliques des plantes qu'elles butinent et ce, en fonction de leurs capacités métaboliques tant à l'état larvaire qu'à l'état adulte.

1.4. Modèles biologiques

1.4.1. *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae)

Appartenant à la famille des Andrenidae, le genre *Andrena* est le plus important, comptant environ 200 espèces en Europe parmi lesquelles *Andrena vaga* (Bellmann, 1999). Cette espèce d'abeille sauvage univoltine est l'une des andrènes les plus précoces dont la période de vol s'étale de mars à mai. Dès le début du printemps, l'espèce émerge de concert avec l'arrivée des premières journées ensoleillées (Bellmann, 1999 ; Vereecken *et al.*, 2006). S'agissant d'une espèce protandre, les mâles, nettement plus petits, apparaissent en mars avant les femelles. Ils volent en nuées au ras du sol, recherchant des partenaires afin de s'accoupler. Les femelles, mesurant de 13 à 14 mm, émergent plus tardivement (Bellmann, 1999).

De couleur noire, l'andrène vague arbore un abdomen brillant et une tête ainsi qu'un thorax revêtus de poils gris pâle (Fig.12 ; Bellmann, 1999). Elle se rencontre à travers toute la région paléarctique (Fig.13 ; Bischoff *et al.*, 2003).

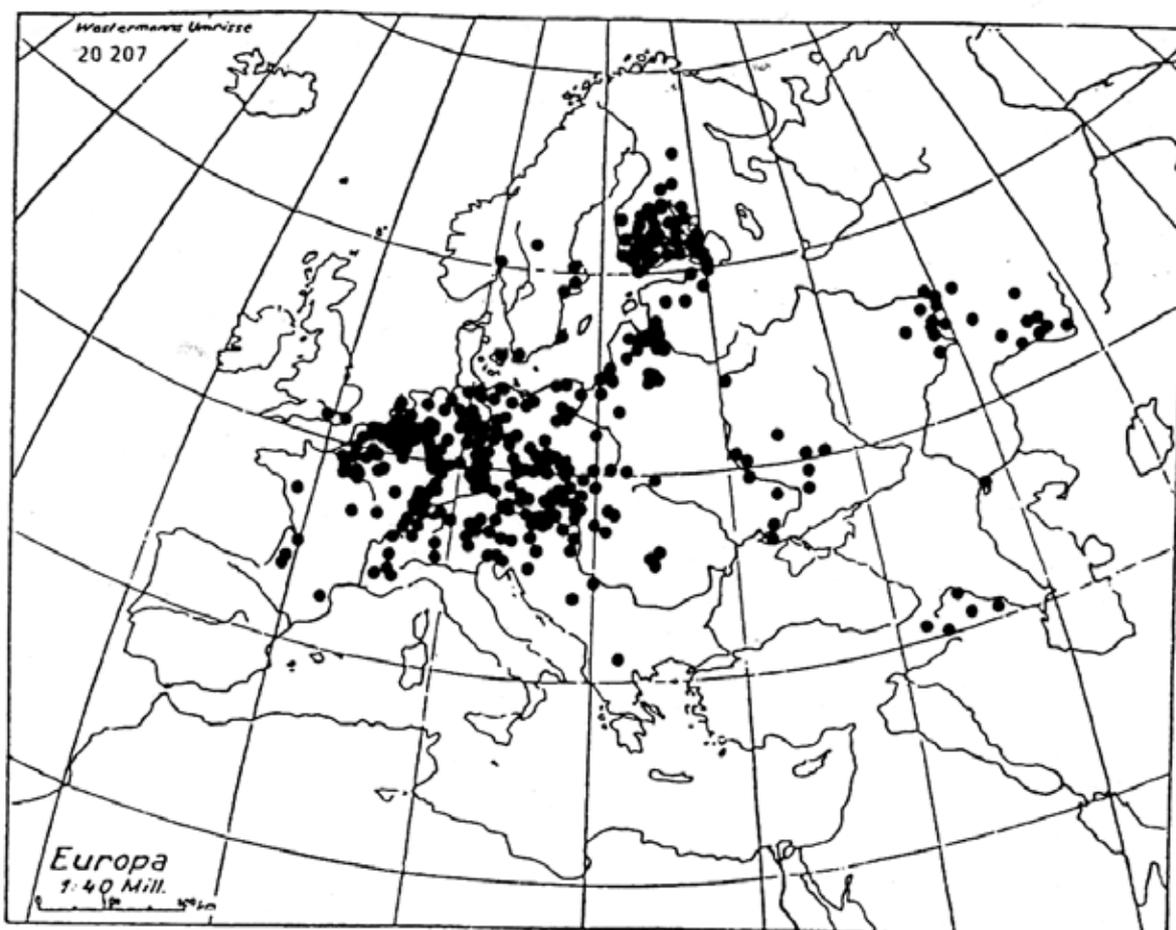
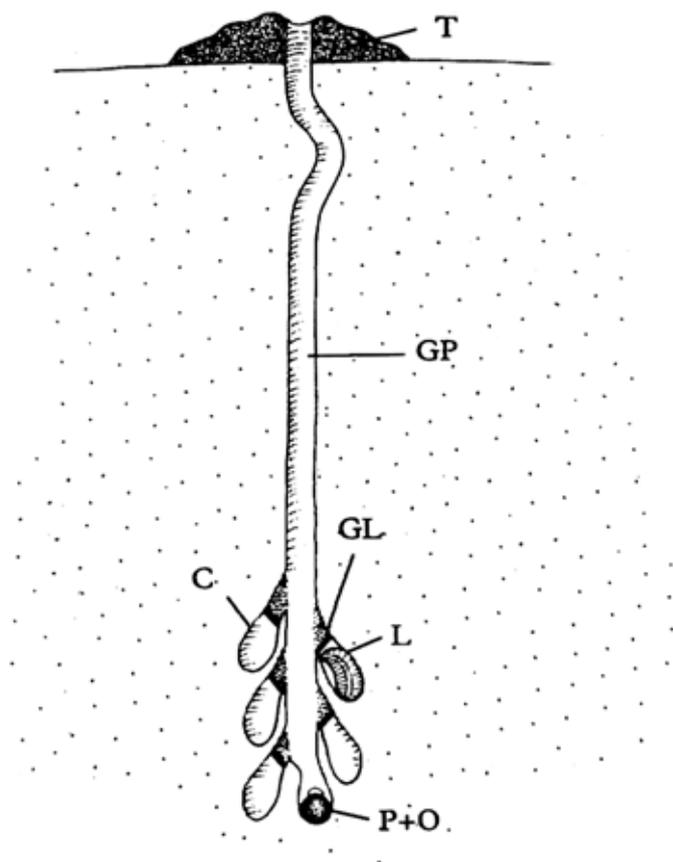


Figure 13 : Carte de distribution d'*Andrena vaga* (Panzer), d'après Gusenleitner & Schwarz, 2002.



Figure 12 : Andrena vaga. A gauche, mâle ; à droite, femelle chargée de pollen de Salix sp. sur les pattes postérieures (Photographies de N. Vereecken).



Largement répandue, cette abeille des sables nidifie dans les terrains sablonneux des coteaux bien exposés au soleil. Son nid se compose d'une galerie principale s'enfonçant à la verticale d'au moins 25 cm, parfois plus de 50 cm, et se ramifiant en plusieurs galeries latérales, chacune s'achevant par une loge sphérique (Fig.14; Bellmann, 1999; Pouvreau, 2004; Vereecken *et al.*, 2006).

Figure 14: Nid d'*Andrena vaga*.

C: cellule ; GL: galerie latérale ; GP: galerie principale ; L: larve ; P+O: pain de pollen avec un œuf ; T: tumulus (Pouvreau, 2004; modifié).

Spécialisée sur les fleurs de saule (*Salix* sp.), l'andrène vague récolte du pollen sur ses pattes postérieures et du nectar dans son jabot, se pourvoyant pour les deux exclusivement sur des saules en fleurs (espèce strictement oligolectique) (Bischoff *et al.*, 2003; Müller & Kuhlmann, 2008; Vanderplanck *et al.*, 2009).

Pourvue de brosses de récolte fortement développées (Fig.15), la femelle peut accumuler d'importantes quantités de pollen (Bischoff *et al.*, 2003). Cependant, la pilosité corporelle relativement réduite de cette espèce limite sa thermorégulation restreignant sa période de récolte.



Figure 15 : Patte postérieure d'andrène possédant des poils très denses et une brosse de poils sur sa base (flèche) (Bellmann, 1999).

La taille des scopae ainsi que l'importance de la pilosité corporelle régissent les rythmes d'activité et d'approvisionnement en pollen et en nectar chez *Andrena vaga* (Fig.16 ; Bischoff *et al.*, 2003; Vereecken *et al.*, 2006).

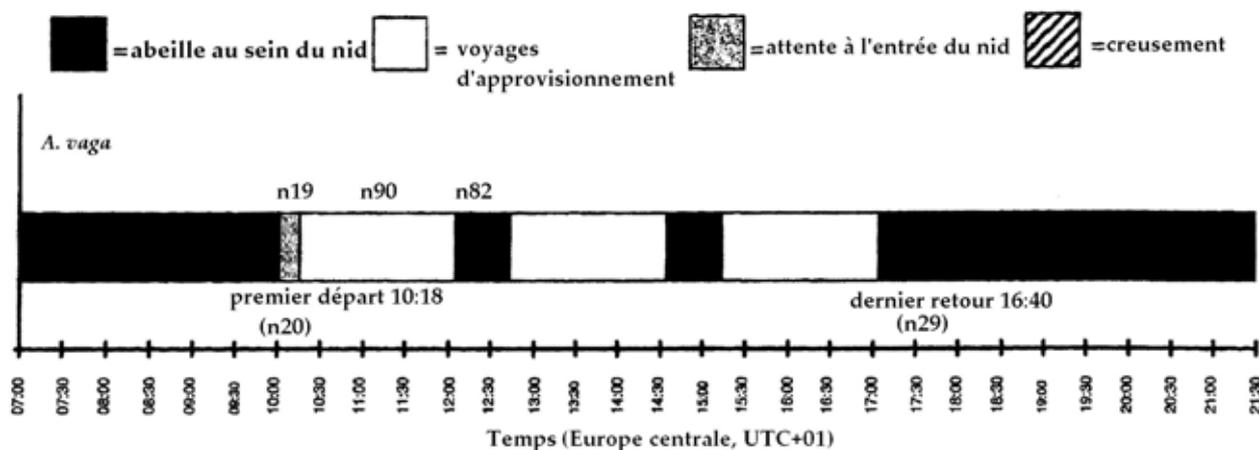


Figure 16: Ethogramme idéal. Activité d'approvisionnement d'*Andrena vaga*. L'andrière vague effectuée en moyenne trois voyages par jour. Elle commence son premier voyage à 10 :32 après un temps d'attente à l'entrée du nid. Les femelles restent en moyenne une demi heure dans le nid entre deux voyages d'approvisionnement, aucune activité de creusement n'est observée durant cette période. A 16 :37, *Andrena vaga* termine son dernier voyage et referme l'entrée de son nid (Bischoff *et al.*, 2003).

Le pollen collecté par la femelle est mélangé à du nectar pour former une pâte nourricière accumulée dans les loges larvaires exemptes de tout revêtement interne (lactone ou autre substance protectrice) (Fig.17 ; Pouvreau, 2004; Vereecken *et al.*, 2006). La femelle pond ensuite un œuf à la surface de ce pain de pollen et referme la cellule larvaire avec un bouchon de sable. Elle commence alors la construction et l'approvisionnement d'une nouvelle cellule. Entre deux approvisionnements, la femelle obture l'entrée de son nid. Cet aspect comportemental rend le repérage des nids plus difficile et semble limiter l'action des cleptoparasites (Fig.18). Cette abeille solitaire nidifie généralement en grand nombre sur des espaces restreints quand les conditions sont favorables (une cinquantaine de nids sur un mètre carré), chaque femelle ne s'occupant que de son propre nid. Ces agrégations peuvent comporter plusieurs centaines de nids en activité, comptant parfois plusieurs milliers d'individus (Bellmann, 1999 ; Bischoff 2003 ; Vereecken *et al.*, 2006).

Vers avril-mai, les femelles cessent leurs activités et meurent avant que leur progéniture ne parvienne à l'état adulte (Bellmann, 1999 ; Pouvreau, 2004). Durant la même période, les larves se développent rapidement puis restent quelques temps en diapause. C'est en plein été qu'a lieu la nymphose, suivie de la mue en insecte parfait à la fin de l'été (Bellmann, 1999). Les imagos passent alors tout l'hiver dans leurs cellules protectrices pour n'émerger qu'au printemps suivant et perpétuer le cycle de l'espèce en reproduisant instinctivement les mêmes comportements que leurs parents.



Figure 17 : Détail d'une cellule d'Andrena vaga. La femelle pond un œuf unique sur le pain de pollen formé d'un mélange de pollen et de nectar disposé dans une loge sphérique exempte de recouvrement interne (photographie de N. Vereecken).

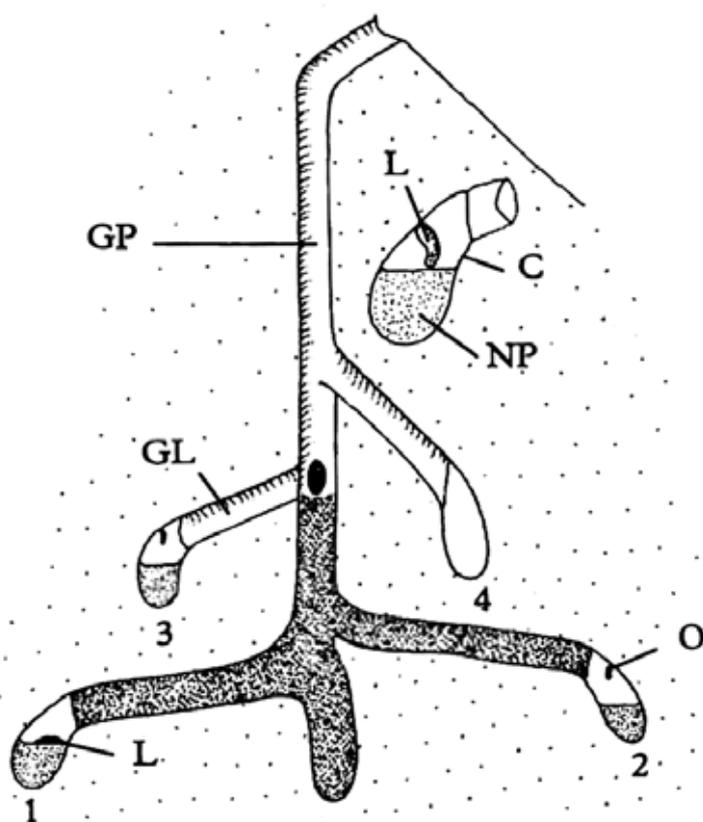


Figure 18 : Abeille coucou Nomada lathburiana (Hymenoptera, Apidae) à l'entrée d'un nid d'andrière dont les antennes sont perceptibles (photographie de N. Vereecken).

1.4.2. *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera, Colletidae)

Colletes cunicularius est une abeille solitaire printanière couramment observée en syntopie avec *Andrena vaga* dont elle partage les exigences écologiques (Vereecken *et al.*, 2006). Alors que la plupart des espèces indigènes apparaissent quelques semaines voire quelques mois après le début du printemps, les premiers imagos de *Colletes cunicularius* commencent à émerger bien plus tôt et volent de mars à mai. Mesurant de 13 à 15 mm, il s'agit de la plus grande des Collètes, raison pour laquelle il est difficile de la confondre avec d'autres espèces du même genre (Bellmann, 1999). A pilosité abondante et hérissée, elle possède un thorax brun-roux. (Fig.19) (Bellmann, 1999). Elle se rencontre à travers toute la région paléarctique, calquant la distribution d'*Andrena vaga* (Bischoff *et al.*, 2003). Cette abeille, autrefois commune, est actuellement très menacée. Elle est de ce fait intégralement protégée sur le plan national.

Espèce psammophile, elle nidifie dans les sols sablonneux meubles, la plupart du temps sur des surfaces horizontales ou légèrement en pente (Bellmann, 1999). Décrite comme « grégaire », cette espèce forme généralement des agglomérations, ou bourgades, localisées sur des espaces restreints et comprenant de 20 à 30 nids par mètre carré (Pouvreau, 2004; Vereecken *et al.*, 2006). Les abeilles sauvages étant qualifiées de protandres, les mâles émergent de leur loge nymphale avant les femelles et consacrent la majeure partie de leur temps à patrouiller le site de nidification à la recherche d'une partenaire sexuelle (Fig.20 et 21 ; Vereecken *et al.*, 2006).



Après l'accouplement, la femelle commence la construction d'un nid souterrain dont l'architecture est similaire à celle observée chez *Andrena vaga* (Fig.22 et 23; Malyshev, 1936; Vereecken *et al.*, 2006).

Figure 23: Nid de *Colletes cunicularius*.

C: cellule ; GL: galerie latérale ; GP: galerie principale ; L: larve ; NP: mélange de nectar et de pollen ; O: œuf (Pouvreau, 2004).



Figure 19 : Femelle de Colletes cunicularius chargée de pollen sur les pattes postérieures (photographie N. Vereecken).



Figure 20 : Mâles de Colletes cunicularius à la recherche de femelles émergentes. Chez cette espèce, le site de nidification constitue également le théâtre de rencontre entre mâles et femelles (photographie N. Vereecken).



Figure 21 : Couple de Colettes cunicularius (à gauche le mâle, à droite la femelle) (photographie N. Vereecken).



Figure 22 : Femelle de Colletes cunicularius creusant la galerie principale de son nid par à-coups en marche arrière. La tête dirigée vers l'entrée de la galerie, la femelle remonte le matériel excavé à l'entrée du nid à l'aide des pattes antérieures. L'épithète spécifique cunicularius fait référence à la morphologie de l'entrée du nid qui évoque une garenne de lapin (photographie de N. Vereecken).

Chez *Colletes cunicularius*, les entrées des nids sont facilement reconnaissables par l'accumulation de sable issu du creusement de la galerie par la femelle (tumulus). Ce matériel excavé reste constamment à l'entrée du nid qui garde sa forme caractéristique évoquant une garenne de lapin. Une galerie principale débouche sur des loges larvaires ovales oblongues et indépendantes (Vereecken *et al.*, 2006). Chaque cellule est tapissée d'une fine pellicule translucide constituée de composés chimiques appelés lactones macrocycliques. Ce liquide huileux sécrété par la glande de Dufour de la femelle sèche et donne lieu à une membrane continue ayant l'aspect de cellophane (Fig.24). Cette enveloppe protectrice imperméable, aux propriétés antifongiques et antibactériennes, préserve le contenu de la cellule de l'humidité et de la formation de moisissures (Fancke *et al.*, 1984; Pouvreau, 2004; Vereecken *et al.*, 2006). Les cellules sont approvisionnées en pollen et en nectar régurgité par les femelles (Pouvreau, 2004). Ces provisions semi-liquides contiennent une proportion plus importante de nectar (Fig.24).

Grâce à sa taille plus grande et sa pilosité thoracique plus importante, *Colletes cunicularius* bénéficie d'une meilleure thermorégulation et commence à collecter plus tôt au matin qu'*Andrena vaga* (Fig.25 ; Bischoff *et al.* 2003).

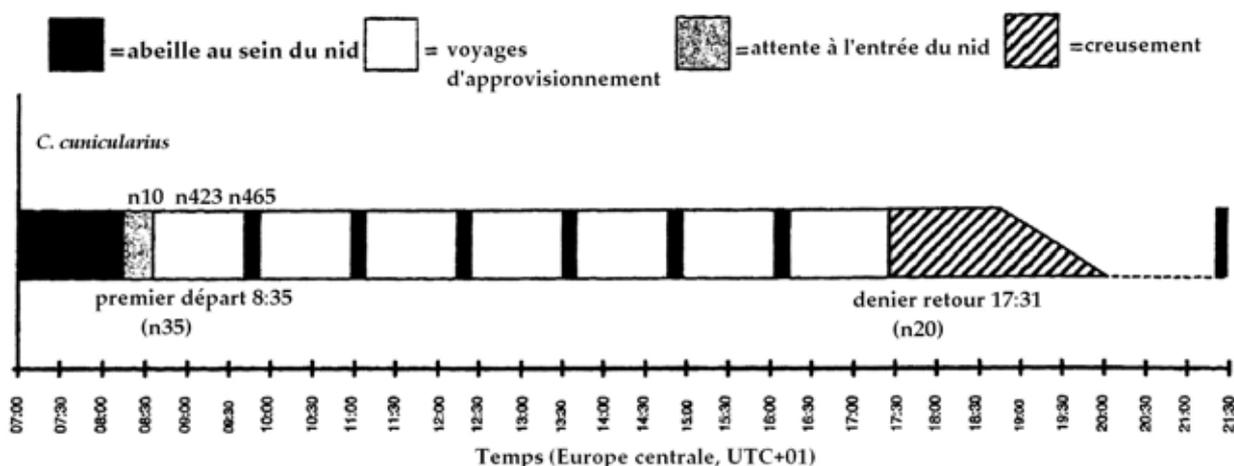


Figure 25 : Ethogramme idéal. Activité d'approvisionnement de *Colletes cunicularius* (ligne discontinue = fin de l'activité de creusement inconnue). La collète commune commence son premier voyage à 8 :37 après un temps d'attente de 20 minutes à l'entrée du nid. Elle effectue sept voyages par jour et termine son dernier voyage à 17:34. Elle n'interrompt pas ses cycles de récolte pour creuser ou effectuer toute autre activité au sein du nid, comme l'indiquent les courtes périodes de séjour dans le nid (six minutes en moyenne). En soirée, après le dernier retour au nid, plusieurs femelles commencent la construction de terrier et continuent même à l'obscurité (Bischoff *et al.*, 2003).

Bien qu'elle ait longtemps été considérée comme strictement oligolectique sur *Salix* sp., des observations suggèrent fortement que *Colletes cunicularius* visite des fleurs autres que celles du saule telles que *Rubus* sp., *Sorbus* sp., *Quercus* sp., *Ilex* sp. ou encore *Pyrus* sp. (Bischoff *et al.* 2003; Müller & Kuhlmann 2008; Vanderplanck *et al.*, 2009). Il est donc fort probable qu'il s'agisse d'une espèce polylectique avec forte préférence sur saule.



Figure 24 : Détail d'une cellule larvaire de Colletes. La loge larvaire est imperméabilisée par une membrane constituée de lactones macrocycliques secrétées par les glandes mandibulaires de la femelle. L'œuf est accroché à cette paroi et plonge dans un mélange nectar-pollen semi-liquide constituant le pain de pollen (photographie de N. Vereecken).

1.5. Objectif

L'objectif de ce travail est double :

- (i) Etudier la composition stérolique, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, tout au long du cycle de l'insecte en passant par le pollen de la plante hôte (ou de la plante préférentiellement butinée dans le cas de *Colletes cunicularius*), les pains de pollen, les larves et les femelles (éventuellement les mâles si nécessaire) (Fig.26).

L'objectif de cette analyse est de mettre en évidence les principaux stérols contenus dans les organismes des insectes et d'examiner si la composition en stérols de l'individu est fonction de la nature des stérols contenus dans son alimentation naturelle (pollen).

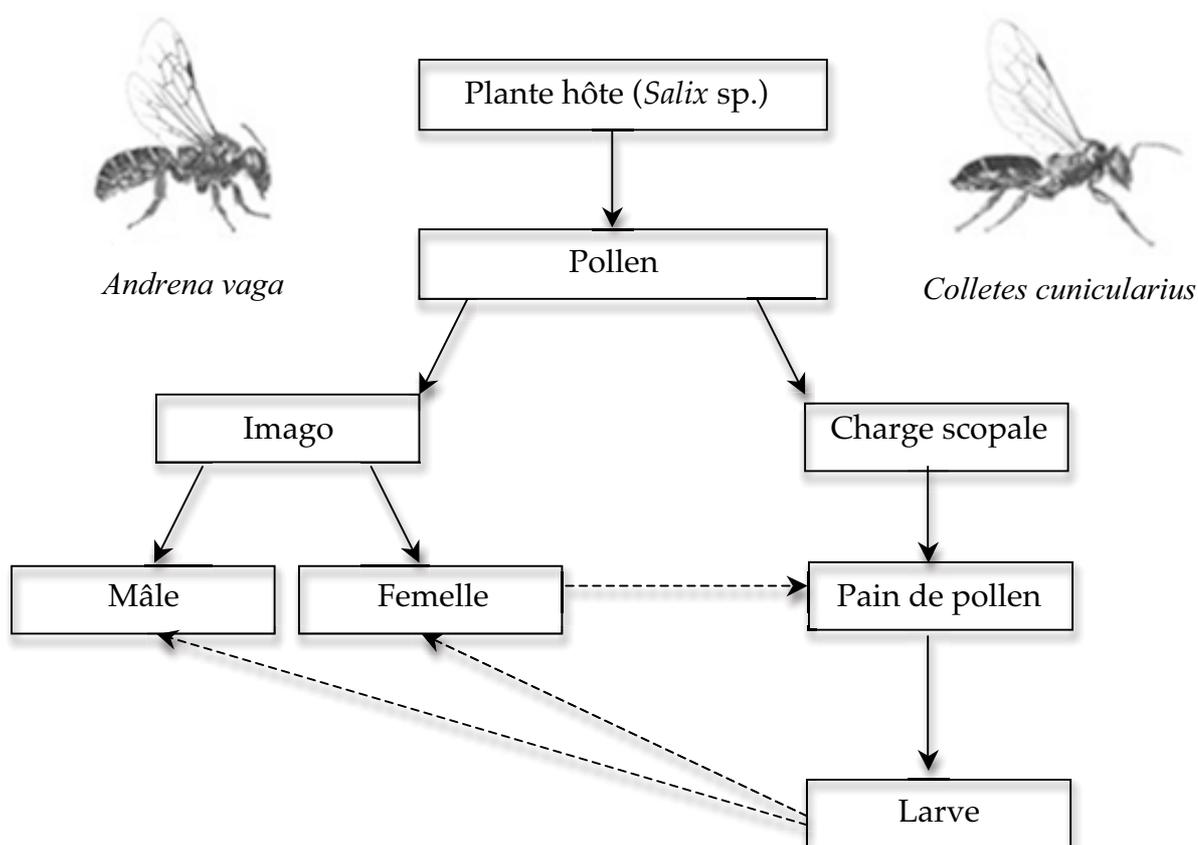


Figure 26: Schéma représentant le cheminement des (phyto-)stérols. Chaque cadre indique une étape clef, les flèches en trait continu représentent les transferts directs des stérols et les flèches en trait discontinu, d'autres transferts possibles.

Les différentes comparaisons seront établies afin de répondre aux questions clefs suivantes:

- Y a-t-il une différence de composition stérolique entre le pollen collecté par la femelle et le pain de pollen qu'elle confectionne pour sa progéniture?
 - Les larves présentent-elles un profil stérolique calqué sur leur alimentation ou ont-elles un profil stérolique qui leur est propre?
 - Quelles sont les différences entre les profils stéroliques larvaires et adultes?
 - Les adultes présentent-ils un profil stérolique calqué sur leur alimentation ou un profil stérolique bien distinct?
- (ii) Comparer les compositions stéroliques, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, entre deux espèces butinant majoritairement la même plante mais avec des degrés de spécialisation différents (oligolectisme dans le cas d'*Andrena vaga* ou polylectisme avec grande préférence pour *Salix* sp. en ce qui concerne *Colletes cunicularius*).

L'objectif de cette expérience est de comparer les principaux stérols des espèces entre elles et de fournir des indices sur les éventuelles différences de métabolisme au sein des différentes espèces.

L'investigation de ces deux aspects nécessite une adaptation préalable de la méthode d'analyse des stérols de Lognay *et al.* (1989, 1992) à des quantités inférieures à celles investiguées lors d'études précédentes (Regali, 1996 ; Rasmont *et al.*, 2005) afin d'envisager des mesures individuelles pour chaque matrice. Si ces micro-quantifications stéroliques sont concluantes, il sera alors possible de mettre en évidence des variations biologiques intraspécifiques.

Un autre préambule nécessaire à ces analyses est la vérification des degrés de spécialisation renseignés dans la littérature pour ces deux espèces ainsi que l'analyse de la composition palynologique de chacun des échantillons analysés afin de faire la relation entre le pollen de la plante et le profil stérolique.

2. Matériel et méthode

2.1. Echantillonnage et conservation du matériel biologique

2.1.1. Situations géographiques des sites de capture des abeilles et descriptions

2.1.1.1. Grande Bruyère de Blaton

Les observations ont été réalisées en avril 2008, juin 2008, mars 2009 et avril 2009 sur le site de la Grande Bruyère de Blaton. Ce vaste site, altéré par le déversement de déchets et la fréquentation par les engins tout-terrain, bénéficie depuis peu du statut de réserve naturelle domaniale. Il est exceptionnel par la présence de nombreuses espèces végétales et animales protégées (Barone, 1999).

Il comprend notamment des étendues de sables non ou peu fixés, colonisées par une végétation caractéristique, des lambeaux de lande à callune colonisés par les genêts à balais et les bouleaux, des zones densément envahies de saules, quelques petits massifs boisés ainsi qu'une zone humide. En outre, on y retrouve en moindre proportion cerisier, tussilage, luzule, cardamine et pissenlit. L'intérêt entomologique de ce site est exceptionnel, notamment par la présence d'une très grande diversité hyménoptérologique dont certaines espèces protégées.

Deux stations ont été établies, la première au sein même du site de la Grande Bruyère de Blaton (Belgique, Hainaut, Blaton, WGS84 50°29'30.2''N 03°40'25.5''E ca 56.4m) et la seconde plus aux abords (Belgique, Hainaut, Blaton, WGS84 50°29'26.7''N 03°40'55.9''E ca 60.6m) (*Fig.27 et 28*). La liste complète des stations de collecte à la Grande Bruyère de Blaton est reprise dans l'annexe 2.

Figure 27 : Localisation des stations établies sur le site de la Grande Bruyère de Blaton (source: Google Earth).



Figure 28 : Grande Bruyère de Blaton (Photographies de M. Vanderplanck, 11.V.2009)

(c) Station établie aux abords du site (WGS84 50°29'26.7''N 03°40'55.9''E)

(d), (c) Station au sein même du site de la Grande Bruyère de Blaton (WGS84 50°29'30.2''N 03°40'25.5''E)

2.1.1.2. Dunes de Pont-Mahé

Afin de compléter l'échantillonnage des pains de pollen de *Colletes cunicularius*, des excavations de nids ont été réalisées le 22 avril 2009 au sein des dunes de Pont-Mahé (FR44, Assérac, lieu-dit Pont-Mahé, WGS84 47°27'11.5''N 02°27'11.5''E) (Fig.29 et 30). Ce site de vingt-huit hectares est l'un des rares espaces dunaires bien conservés en Loire-Atlantique et fait partie des cordons sableux les plus typiques et les plus riches du département. Intégré au réseau Natura 2000 depuis avril 2006, la valeur biologique de ce site est également reconnue par son inscription en tant que zone naturelle d'intérêt écologique et floristique de type 1 (secteur de grand intérêt biologique ou écologique).

Ce milieu biologique héberge une faune et une flore remarquables. Il se compose d'une végétation dunaire halonitrophile, d'un cordon dunaire interne boisé (pinède dense de pins maritimes), de pelouses rases regroupant différents secteurs avec leurs cortèges floristiques associés (secteurs remaniés à oyat, secteurs décalcifiés à canche blanchâtre et secteurs humides à saule des dunes) et de landes hautes. Ces dunes présentent ainsi la quasi-totalité des groupements végétaux et plantes types de ce milieu dont de nombreuses espèces protégées (entre autre le saule des dunes, *Salix repens ssp arenaria*) et de nombreuses espèces rares. La station établie au sein de ce site est également listée dans l'annexe 2.

2.1.2. Pollen

2.1.2.1. Pollen floral collecté manuellement

Des fleurs de saule ont été collectées au sein de deux sites les 24 et 27 mars 2009 (respectivement ; Belgique, Hainaut, Soignies WGS84 50°35'12,72''N 04°03'47,97''E et Belgique, Hainaut, Mons, WGS84 50°28'25,61''N 03°56'44,97''E). Durant près de trois semaines, le pollen a été récolté manuellement à l'aide d'un diapason dont les vibrations permettent de détacher des étamines les grains de *Salix caprea* et de les recueillir au sein d'un verre de montre. Le pollen est préalablement nettoyé sous binoculaire afin d'éliminer les résidus provenant des chatons de saule. Après avoir été pesé, l'échantillon est lyophilisé avant d'effectuer une nouvelle prise de poids. Le ratio poids sec/poids frais peut alors être établi. L'échantillon est conservé à -40°C dans un tube eppendorf.

Un total de 200 mg de pollen frais a été recueilli.

2.1.2.2. Pollen collecté par les femelles d'abeilles

Contrairement au bourdon (*Bombus terrestris*) et à l'abeille domestique (*Apis mellifera*), le pollen récolté par les femelles d'espèces solitaires n'est pas sous forme de pelotte compacte. Les grains de pollen restent épars au sein de la pilosité de l'insecte rendant inefficace un quelconque système de trappe disposé à l'entrée du nid pour dépouiller les butineuses de leurs charges.

Pour connaître la flore utilisée par les abeilles et déterminer le profil stérolique des pollens exploités, il est donc indispensable de capturer des femelles avec des charges de pollen. Les différents échantillons sont alors disposés à -40°C afin de rendre les femelles inactives et éviter toute agression de la part de l'insecte.

Une à une, les femelles sont maintenues à l'aide d'une pince au-dessus d'un eppendorf prépesé et débarrassées de leurs charges polliniques par passages successifs d'un petit crochet peignant leurs pattes postérieures. Seules sont rassemblées au sein d'un même eppendorf les charges scopales d'une même espèce d'abeille et composées de pollen monofloral provenant de la même espèce végétale (tout du moins du même genre). Le pollen est préalablement nettoyé sous binoculaire afin d'éliminer les résidus provenant des pattes des femelles. Après avoir été pesé, l'échantillon est lyophilisé avant d'effectuer une nouvelle prise de poids. Le ratio poids sec/poids frais peut alors être établi. L'échantillon est conservé à -40°C dans un tube eppendorf.

Au total, 281,9 mg de pollen frais (*Salix* sp.) ont été recueillis à partir des charges scopales d'*Andrena vaga* contre 54,4 mg pour *Colletes cunicularius*.

2.1.3. Pains de pollen

Par leurs nombreux voyages d'approvisionnement entre les fleurs et les cellules larvaires, les femelles permettent de repérer les entrées de nids actifs.

A l'aide d'une bêche, des nids de chacune des deux espèces sont excavés à une quarantaine de centimètres de profondeur (Fig.31). Les pains de pollen sont soigneusement prélevés et isolés dans une série de tubes eppendorfs numérotés de manière telle que le numéro attribué fasse référence à la station et à l'identifiant de l'échantillon collecté (par exemple, l'eppendorf 2.1 correspond à l'échantillon 1 collecté au sein de la station 2). Les sites d'excavation sont alors remis en état dans la mesure du possible afin de minimiser la perturbation de la population d'abeilles sauvages (Fig.32).

Les pains de pollen - enrobés par leur membrane de cellophane dans le cas *Colletes cunicularius* et exempts de recouvrement dans le cas d'*Andrena vaga* - sont isolés des larves et nettoyés à l'aide d'un pinceau. Ils sont ensuite pesés et lyophilisés afin de déterminer le rapport poids sec/poids frais. Les échantillons sont ensuite conservés à -40°C dans leurs tubes eppendorfs respectifs.

Au total, 15 pains larvaires ont été prélevés pour *Andrena vaga* et 45 dans le cas de *Colletes cunicularius* dont 28 provenant du site des dunes de Pont-Mahé. Le détail des échantillons récoltés au cours de cette étude ainsi que leurs origines sont repris dans l'annexe 1.

2.1.4. Larves

Plus tardivement dans la saison (juin 2008), une seconde série d'excavation a permis de collecter des larves d'*Andrena vaga* à un stade bien avancé, occupant tout le volume de la cellule larvaire au détriment du pain de pollen entièrement consommé. Chacune des larves a été nettoyée avant d'être pesée et placée à -40°C dans des tubes eppendorfs individuels répondant à la même règle de numérotation que celle exposée à la section 2.1.3. La majorité des larves collectées étaient au stade « post-defecating » (dernier stade larvaire s'accompagnant de l'ouverture du tube digestif jusque là aveugle). Un total de 22 larves a été prélevé.

Pour *Colletes cunicularius*, l'excavation menée sur le site de la Grande Bruyère de Blaton en juin 2008 n'a pas permis de collecter des larves suffisamment développées que pour obtenir des résultats significatifs. Une excavation supplémentaire sur le même site en juin 2009 a quant à elle permis de récolter un effectif suffisant de larves à un stade plus ou moins avancé. Dans un premier temps, les larves ont été isolées par ouverture de la cellule larvaire puis nettoyées avant d'être pesées. Au final, un effectif de 19 larves a été prélevé.

Certains pains de pollen n'ayant pas été totalement consommés, une numérotation des eppendorfs larvaires identique à celle des pains de pollen les ayant



Figure 31 : Dunes de Pont-Mahé, Loire-Atlantique. Excavation des nids de Colletes cunicularius. (Photographie de G. Mahé, 22.IV.2009).



Figure 32 : Dunes de Pont-Mahé, Loire-Atlantique. Remise en état du site après excavation des nids de Colletes cunicularius. (Photographie de G. Mahé, 22.IV.2009).

alimentées durant leurs développements a été préférée afin d'établir l'association si besoin en est.

Le détail des échantillons récoltés au cours de cette étude ainsi que leurs origines sont repris dans l'annexe 1.

2.1.5. Adultes

Les mâles et femelles des deux espèces peuvent être collectés à vue grâce à un filet. La collecte s'est effectuée fin de matinée et début d'après-midi les 17 et 18 avril 2008, période de la journée durant laquelle les deux espèces sont généralement en pleine phase de récolte (Bischoff *et al.*, 2003). Les femelles peuvent être facilement capturées à même le sol lors des approvisionnements des cellules larvaires.

Tous les individus capturés sont isolés dans des eppendorfs numérotés de manière telle que le numéro attribué fasse référence au sexe (symbole), à l'absence (non souligné) ou à la présence (souligné) de charges polliniques, à la station et à l'identifiant de l'individu collecté (l'eppendorf ♀ 2.1 correspond par exemple à la femelle 1 capturée au sein de la station 2 et ayant des charges de pollen). Ils sont ensuite pesés et conservés à -40°C dans leurs tubes eppendorfs respectifs.

78 femelles d'*Andrena vaga* dont 54 transportant des charges de pollen ont été capturées. Concernant *Colletes cunicularius*, un effectif de 29 femelles dont 16 aux scopae remplis a été collecté. Au vu de la grande variabilité chromatographique des profils stéroïdiques des femelles d'andrène, un effectif de 15 mâles a été collecté afin de déterminer si la variabilité observée était un caractère intrinsèque à l'espèce ou un caractère sexuel. Les 7 mâles de *Colletes cunicularius* n'ont quant à eux pas été exploités pour des raisons indépendantes de notre volonté (effectif insuffisant et manque de temps). Le détail des échantillons récoltés au cours de cette étude ainsi que leurs origines sont repris dans l'annexe 1.

2.2. Analyses palynologiques

2.2.1. Grande Bruyère de Blaton

Pour les analyses de pollen, dix femelles de chaque espèce avec charges de pollen ainsi que dix cellules larvaires excavées de leurs nids respectifs ont été envisagées. Une fraction aléatoire de chaque échantillon (n=40) a été investiguée par analyse au microscope optique à un grossissement de 256 fois (REICHERT) afin de déterminer les ressources de pollen des différentes espèces. Les pattes postérieures de chaque abeille ainsi que les réserves polliniques de chacune des cellules larvaires ont été tamponnées à l'aide d'un petit cube de gélatine disposé entre lame et lamelle.

Les échantillons ont été analysés par le laboratoire du centre apicole de recherche et d'information (CARI asbl) situé à Louvain-La-Neuve en Belgique (Etienne Bruneau). Un balayage systématique des lames a été réalisé afin de dénombrer et d'identifier les différents pollens présents (Fig.33), cela afin d'établir le pourcentage de pollen des différentes espèces présentes. Les pourcentages sont moyennés pour tous les échantillons de chacune des espèces.

2.2.2. Dunes de Pont-Mahé

Les vingt-huit cellules larvaires excavées des nids de *Colletes cunicularius* ont été analysées au microscope optique à un grossissement de 400 fois (LEITZ) afin de déterminer les ressources de pollen exploitées par l'espèce. Chacun des pains de pollen a été tamponné à l'aide d'un petit cube de gélatine disposé entre lame et lamelle afin d'investiguer une fraction aléatoire de chaque échantillon (n=28).

Dans un premier temps, un balayage systématique « grossier » des lames a été réalisé afin de déterminer les cinq échantillons contenant la plus grande proportion de pollen autre que le saule. L'identification des différents types de pollen est effectuée par comparaison avec des lames de référence.

Pour chacun de ces échantillons sélectionnés, le pourcentage de pollen des différentes espèces florales présentes a été déterminé par dénombrement des grains le long d'un transect choisi de manière à faciliter l'identification des types de pollen (encombrement moindre).

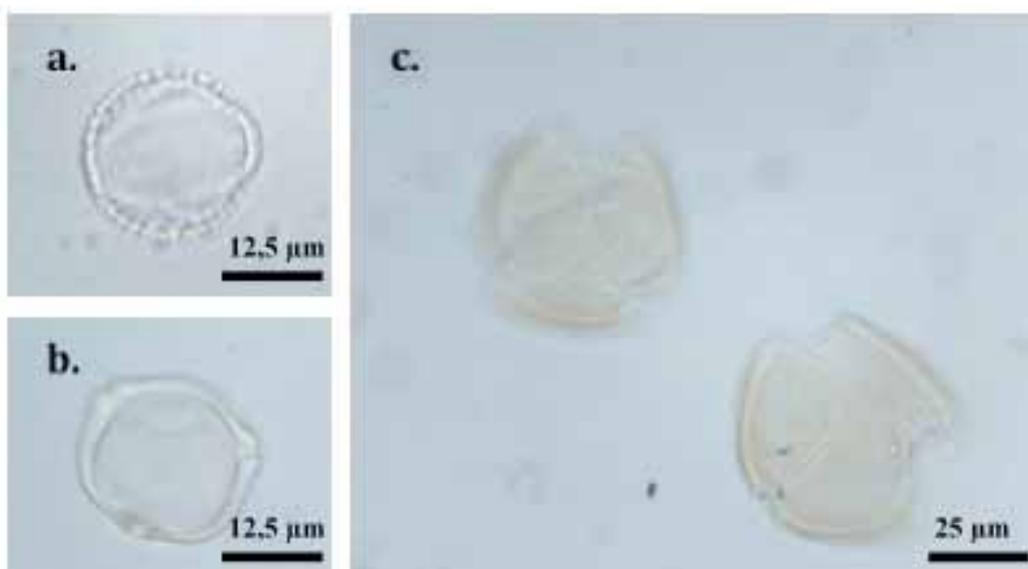


Figure 33 : Exemples de pollens de référence sur lames provenant du centre apicole de recherche et d'information (CARI): a. pollen de saule (Salix sp.); b. pollen de bouleau (Betula pendula) et c. pollen de cerisier (Prunus avium).

2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives

Pour chaque matrice envisagée (pains de pollen, larves et adultes), dix échantillons individuels ont été analysés. Concernant les analyses stéroliques de type palynologique, des répétitions – en nombre variable selon la quantité disponible – ont été réalisées tant sur le pollen collecté manuellement que sur le pollen collecté par chacune des deux espèces afin de vérifier l'absence de modification du profil stérolique entre le pollen floral et le pollen scopal (Barbier, 1970). Un total de douze échantillons de pollen a été analysé (cinq répétitions sur le pollen de saule floral, quatre répétitions sur le pollen de saule collecté par *Andrena vaga*, deux répétitions de pollen de saule et un échantillon de pollen fruitier collectés par *Colletes cunicularius*).

Cette section consiste en un développement théorique de la méthode d'analyse des stérols de Lognay *et al.* (1989, 1992), méthode de départ qui a dû être adaptée aux analyses de cette étude (le protocole analytique est repris dans la section résultats au point 3.3.1.).

2.3.1. Préparation de la fraction insaponifiable

Saponification

Cette opération vise à séparer la partie insaponifiable, contenant les stérols, de la partie saponifiable à l'aide d'hydroxyde de potassium méthanolique. La réaction est réalisée à 80°C pendant une heure. L'hypothèse de base est que les pertes tout au long de l'analyse, y compris dans l'injection, ne changent pas les proportions relatives des constituants du mélange. Dès lors, un standard interne (ISTD) de concentration connue est ajouté dès le début de l'analyse (après saponification) afin de pouvoir quantifier les différents composés stéroliques présents dans l'échantillon (méthode du standard interne).

Critères de choix du standard interne :

- Il doit être absent de l'échantillon à doser
- Il doit être convenablement séparé des pics voisins
- Son temps de rétention doit être proche du constituant à doser
- Son comportement devrait être identique à celui de l'analyte dans toutes les étapes du traitement.

Pour l'analyse quantitative des stérols en chromatographie en phase gazeuse, la bétuline a été sélectionnée comme étalon interne (Lognay *et al.*, 1992). Les facteurs de réponse relatifs cholestérol/bétuline obtenus par le FID (flame ionization detector) seront utilisés pour calculer les teneurs des autres molécules (Lognay *et al.*, 1995).

Extraction

La fraction insaponifiable est extraite à l'aide d'un solvant adéquat tel que le diéthyléther. Plusieurs rinçages à l'eau de la phase organique sont alors effectués en vue d'éliminer la majorité des savons résiduels.

2.3.2. Fractionnement de l'extrait insaponifiable

L'extrait brut est ensuite fractionné par chromatographie sur couche mince. Le principe de la chromatographie sur couche mince (CCM) est, comme pour toutes les méthodes de chromatographie, un procédé de partage en multi-étapes. Ce procédé nécessite un adsorbant (la phase stationnaire), un solvant ou un mélange de solvants (la phase mobile, généralement appelée éluant : chloroforme/éther/ammoniac (90 :10 :0,5)) et le mélange à séparer. L'adsorbant est déposé en une mince couche sur un support approprié (plaque de verre). L'élution par la phase mobile permet de séparer les constituants du mélange.

Cette méthode de séparation micro-analytique offre une optimisation rapide de la séparation par le changement des phases mobiles et stationnaires. Les substances séparées peuvent ensuite être soumises à une analyse complémentaire telle que la spectroscopie de masse.

La réalisation d'une CCM se fait en plusieurs étapes :

Préparation de l'échantillon : Dans ce cas-ci, une pré-séparation (saponification) a été effectuée suivie d'une extraction afin d'éliminer la partie saponifiable de l'échantillon.

Dépôt de l'échantillon : Dans le cas de la chromatographie préparative, l'échantillon est appliqué de façon linéaire sur la largeur de la plaque à l'aide d'un applicateur composé en partie d'une seringue où est placé l'échantillon. Il est primordial d'éviter de déposer la substance en zones trop larges pour ne pas obtenir de bandes plus larges encore, ce qui diminuerait la résolution. Pour obtenir un dépôt de l'échantillon le plus petit et le plus compact possible, il faut s'y prendre à plusieurs reprises en laissant sécher la plaque entre chaque dépôt. Une autre méthode de dépôts est utilisée pour les spots de référence (mélange cholestérol bétuline à forte concentration) disposés de part et d'autre de l'échantillon à une distance empêchant toute contamination de l'échantillon (Fig.34). Il s'agit cette fois d'une application point par point à l'aide d'un capillaire en verre. Le capillaire doit être placé perpendiculairement (pour qu'il se vide complètement) et prudemment sur la plaque (pour ne pas endommager la plaque, une plaque endommagée donne des tâches irrégulières).

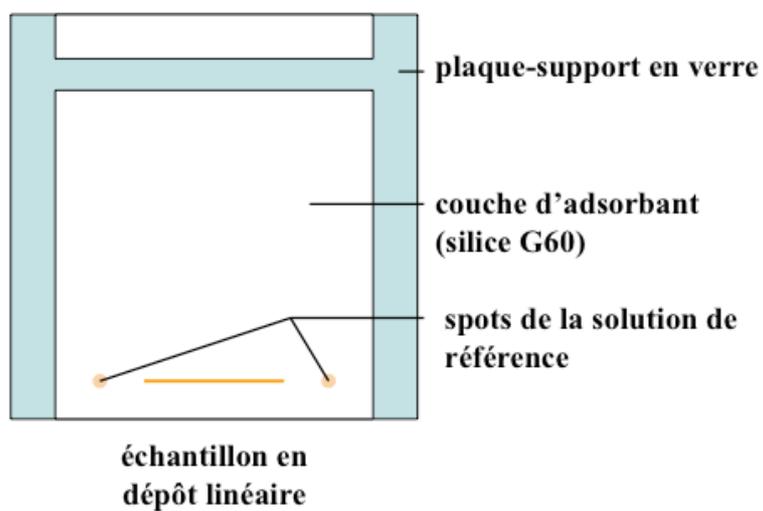


Figure 34 : Schémas des dépôts de l'échantillon (linéaire) et des références (dépôts ponctuels).

Après l'application de l'échantillon et des références, la plaque est séchée à l'air libre durant environ 10 min. Elle ne peut être éluee que lorsque tout le solvant de l'échantillon est évaporé.

Technique de séparation: La méthode utilisée dans le cadre de cette chromatographie préparative est l'élution ascendante effectuée dans une cuve de développement (Fig.35). Il s'agit de la méthode la plus courante.

Interprétation du chromatogramme (analyse qualitative): La visualisation et la localisation des substances séparées s'opèrent simplement par analogie avec les substances de référence chromatographiées en même temps que l'échantillon. L'exploitation qualitative est faite directement sur la plaque grâce aux valeurs caractéristiques du Rf (Fig.36). Contrairement à certains composés tels les pigments végétaux (caroténoïdes et autres), les stérols ne sont pas colorés et leur visualisation ne peut se faire à l'œil nu. Pour visualiser les stérols, il est nécessaire de recourir à une méthode de détection post-chromatographique, c'est-à-dire une réaction chimique sur la plaque. En effet, la localisation des stérols peut être effectuée par vaporisation de 2',7'-dichlorofluorescéine, réactif non spécifique qui forme avec tous les lipides des taches fluorescentes vert-clair révélées à une longueur d'onde de 254 nm, sous lampe UV (Goad & Akihisa, 1997).

La plaque développée, séchée et prête à être traitée est disposée sur une feuille de papier filtre sous la hotte. La vaporisation du réactif se fait à 15 cm de la plaque avec un vaporisateur équipé d'un système à air comprimé. Il est préférable de vaporiser la plaque plusieurs fois de suite avec des séchages intermédiaires plutôt que de trop mouiller la plaque en une seule fois afin d'éviter une diffusion des taches.

La valeur du Rf (Rf stérols= 0,45) et l'analogie avec les références (mélange cholestérol/bétuline à forte concentration) permettent de localiser avec certitude les composés d'intérêt (stérols et bétuline).

2.3.3. Récupération des stérols

Lorsque les stérols encore non identifiés et l'ISTD ont été localisés sur la plaque sous lampe UV, ils peuvent être étudiés avec des méthodes d'identification (spectrométrie de masse et autre) après isolation par grattage de la zone et extractions répétées au chloroforme. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous azote.

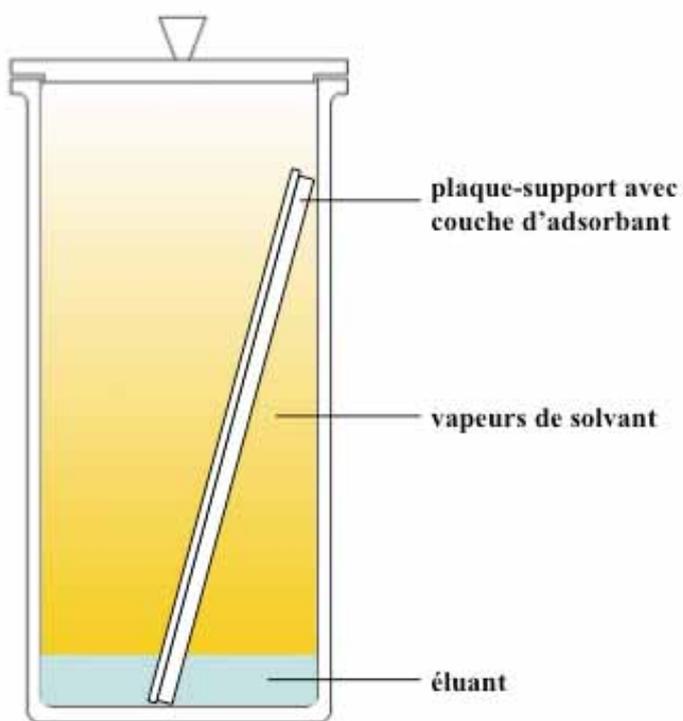


Figure 35 : Cuve de séparation et saturation. Le dégradé de jaune symbolise la densité de vapeurs du solvant.

R_f (Ratio to front) :

Il s'agit du paramètre le plus utilisé pour l'évaluation quantitative. Il s'agit du rapport entre la distance parcourue par la substance et celle parcourue par le front. La valeur de *R_f* est donc définie par la relation :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la substance}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{b}{a}$$

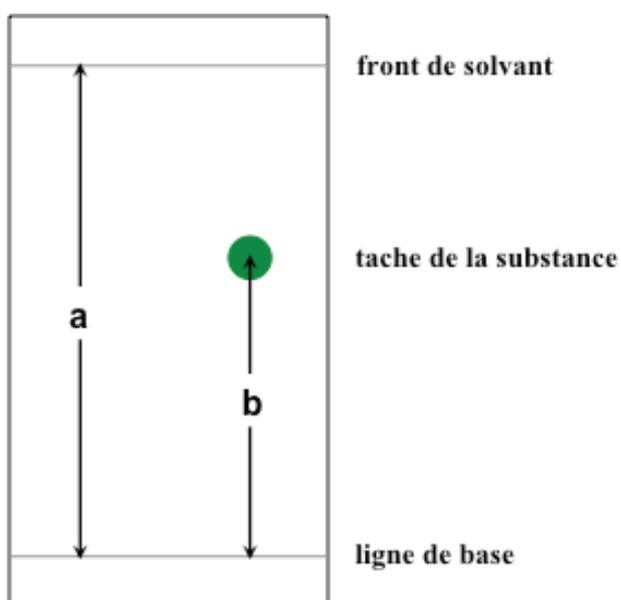


Figure 36 : Représentation schématique d'une plaque de CCM après migration.

2.3.4. Analyse GC / GC-MS

Synthèse des dérivés par silylation

En chromatographie en phase gazeuse (GPC), il est souvent avantageux de dériver les groupements fonctionnels polaires (généralement des atomes d'hydrogène actifs) avec des réactifs appropriés. La silylation utilisée dans le cadre de ces analyses stéroïdiques est la plus couramment utilisée en chromatographie en phase gazeuse. Il s'agit de la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement triméthylsilyle (TMS). Le but de cette transformation est l'augmentation de la volatilité, une plus grande stabilité thermique ou l'abaissement de la limite de détection par l'amélioration de la symétrie des pics (Goad & Akihisa, 1997). L'agent de silylation utilisé est le SILYL-991 (mélange de BSTFA avec 1% de triméthylchlorosilane (TMCS)) (Fig.37). Le BSTFA est un agent de silylation puissant qui permet de silyler de nombreux composés comme les stéroïdes en dérivés très stables. Il est dans ce cas utilisé avec le TMCS. A ces agents de dérivatisation est ajouté un solvant : la pyridine anhydre. Afin d'accélérer la réaction, cette dernière est effectuée à 90°C pendant 30 minutes. L'échantillon est ensuite soumis à une évaporation sous azote avant d'être repris dans du n-hexane.

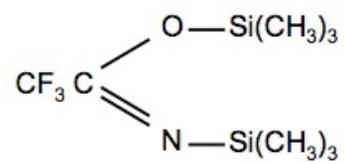
Chromatographie en phase gazeuse: méthode du standard interne

En CPG, le gaz vecteur (phase mobile) parcourt la colonne de séparation à travers laquelle les composants de l'échantillon se déplacent à des vitesses influencées par le degré d'interaction de chaque constituant avec la phase non-volatile stationnaire. Les molécules présentant la plus grande interaction avec la phase stationnaire sont ainsi plus fortement retardées et inversement. En sortie de colonne, les composés sont détectés par un détecteur FID (Flame Ionisation Detector). A chaque instant, le signal de réponse du détecteur est proportionnel à la concentration en constituant détecté. La surface du pic entier est proportionnelle à la quantité totale passée dans le détecteur sauf si il est saturé (concentration trop élevée), la réponse n'est alors plus linéaire.

Pour améliorer la répétabilité des injections et donc des analyses, il est nécessaire de se baser sur un rapport de surface entre le composé à doser et le standard interne.

A partir des chromatogrammes obtenus, le logiciel Chrom-Card calcule l'intégrale de la surface de chacun des pics. Grâce à l'étalonnage, le facteur de réponse des stéroïdes par rapport à la bétuline est connu et, dans la plupart des cas, se trouve proche de l'unité (Lognay *et al.*, 1992). Comme la concentration en standard interne est connue, la concentration en chacun des stéroïdes détectés peut être déduite.

BSTFA [N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide]



TMCS [triméthylchlorosilane]

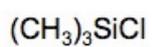


Figure 37 : Formules semi-développées des réactifs de silylation.

Les stérols détectés sont identifiés par comparaison des temps de rétention et des temps de rétention relatifs (tr' calculés par rapport au β -sitostérol-TMS) avec ceux de l'huile de tournesol prise comme référence (composition connue avec certitude). L'huile de colza permet quant à elle d'identifier le brassicastérol (molécule spécifique à la famille des Brassicaceae) selon la même technique.

Afin de vérifier les identifications effectuées à partir des données de rétention mesurées en CPG, les échantillons sont soumis à une analyse en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS). Les données de fragmentation des stérols triméthylsilylés sont alors examinées. Les fragments principaux et caractéristiques sont interprétés sur base de l'expérience de laboratoire et des données rassemblées dans la littérature. Pour valider ces identifications, les profils de fragmentation sont comparés à la librairie de spectrométrie de masse NIST/EPA/NIH version 1.7 (Lognay *et al.*, 1993).

2.4. Analyses statistiques

2.4.1. Généralités

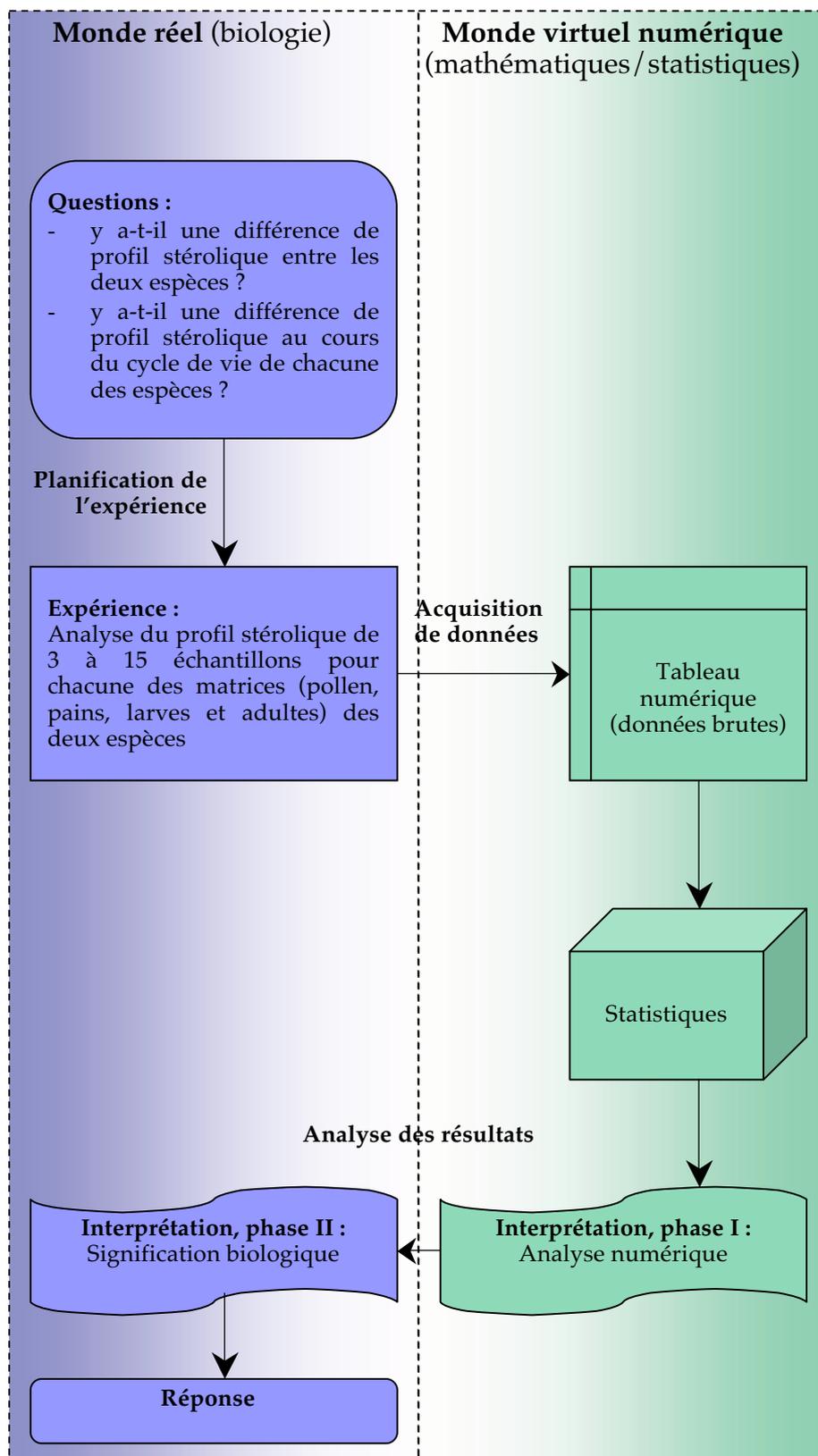


Figure 38 :

Schéma récapitulatif des différentes étapes suivies au cours de cette étude.

Après l'acquisition des données, la démarche statistique permet de traiter et d'interpréter le jeu de données acquis (Fig.38). Les deux grands aspects de cette démarche sont:

- la statistique descriptive ou exploratoire qui permet de synthétiser, résumer et structurer l'information contenue dans les données en ayant recours à des graphiques ou des indicateurs numériques (méthodes de classification ou méthodes d'ordination);
- la statistique inférentielle ou décisionnelle qui, suivant la nature des données (qualitatives, quantitatives, univariées, bivariées ou multivariées), fait appel à différentes méthodes statistiques utilisées pour valider ou infirmer des hypothèses *a priori* ou formulées après une phase exploratoire (tests statistiques) (Saporta, 1990).

L'interprétation numérique des données permet alors de franchir la barrière entre le monde statistique et le monde réel pour replacer l'interprétation dans le contexte de l'étude et apporter des réponses aux questions initialement posées (Fig.38).

2.4.2. Données brutes

Le contenu stérolique total a été déterminé en considérant tous les pics de stérols élués entre le cholestérol et le standard interne de bétuline. Tous les stérols individuels sont exprimés en terme de pourcentage de stérols totaux.

Le jeu de données initial consiste en un tableau « cas X variables » comprenant 87 lignes (un total de 87 échantillons a été analysé) et 12 colonnes :

- 10 variables quantitatives réponses correspondant aux teneurs en stérols suivants: le cholestérol, le 24-méthylène cholestérol, le stigmastérol, le β -sitostérol, le Δ^5 -avénastérol, le cholesténone, le Δ^7 -stigmastérol, le Δ^7 -avénastérol, une inconnue (composé majeur non identifié tr' 1,23) et N.I. (somme de tous les composés mineurs non identifiés élués entre le cholestérol et la bétuline) ;
- 2 variables qualitatives: la variable espèce à trois niveaux (*Andrena vaga*, *Colletes cunicularius* et *Salix* sp.) et la variable nature à cinq niveaux (pollen, pain, larve, femelle et mâle). Selon la question posée (comparaison intraspécifique ou interspécifique), une seule des deux variables qualitatives servira de variable explicative.

2.4.3. Pré-traitement

Afin de résumer la composition stérolique, la moyenne ainsi que les valeurs minimale et maximale pour chaque groupe (nature) ont été calculées et présentées sous forme de tableau pour chacune des espèces (Tab.2, 3 et 4). La concentration en

stérols totaux est également mentionnée pour chaque matrice de chacune des deux espèces afin de permettre une comparaison en terme de quantification absolue.

2.4.4. Analyses multivariées

Pour la suite des analyses statistiques de ce travail, toutes les variables quantitatives ont été transformées ($\log(X+1)$) et standardisées (centrées et réduites, $\mu=0$ et $\sigma=1$) afin d'attribuer la même importance relative à chaque stérol.

2.4.4.1. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) est une approche dite factorielle des données multivariées. Cette méthode d'ordination permet d'étudier simultanément les relations entre toutes les variables et de déterminer les ressemblances et les dissemblances entre les individus.

Elle consiste à résumer les différentes mesures en un nombre plus faible de nouvelles variables de variance maximale, non corrélées deux à deux et qui sont des combinaisons linéaires des variables d'origine. Ces nouvelles variables de synthèse, appelées composantes principales, retiennent l'essentiel de l'inertie et définissent des plans factoriels qui servent de base à une représentation graphique plane des variables initiales dans laquelle est projeté l'ensemble des individus. Cette possibilité de représentation graphique d'un jeu de données multidimensionnel autorise une interprétation plus aisée tant pour les relations entre les variables originelles (espaces des variables) que pour les proximités entre les unités statistiques (espace des individus):

(1) Espace des variables:

Les variables initiales sont représentées par des vecteurs interprétables tant en terme de longueur que de direction:

"Longueur: la longueur des vecteurs indique la qualité de représentation de la variable concernée au sein du plan factoriel. Plus le vecteur est long, au mieux la variable est représentée; raison pour laquelle l'interprétation est concentrée sur les vecteurs les plus longs.

"Direction: le coefficient de corrélation entre deux variables est défini par le cosinus de l'angle de leurs vecteurs respectifs. Ainsi, deux variables orientées dans la même direction sont corrélées positivement tandis que deux variables de directions opposées sont corrélées négativement. Une orthogonalité entre deux variables traduit quant à elle l'absence de corrélation.

(2) Espace des individus :

Les individus sont représentés par un nuage de point au sein d'un graphique croisant les composantes principales (généralement les deux ou trois premières composantes qui capturent la plus grande part de variance du jeu de données). La position des individus sur ce plan factoriel exprime une large part de leur proximité originale dans le jeu de données initial. L'ACP peut par ailleurs être utilisée pour repérer des groupes d'individus.

Une superposition de ces deux espaces permet de caractériser les individus ou groupes d'individus en fonction des variables originelles. Toutefois, les individus et les variables étant des éléments d'espaces différents, une telle représentation simultanée est à proscrire. Les espaces des individus et des variables se complètent mais ne peuvent être superposés (Saporta, 1990).

L'intérêt principal de l'ACP étant de réduire le nombre de dimensions de l'espace des individus tout en conservant un maximum d'inertie contenue dans le jeu de départ, le choix du nombre d'axes à retenir pour l'interprétation est un point essentiel. Au cours de ce travail, la sélection du nombre de composantes principales à retenir a été effectuée selon le critère de Kaiser.

La règle de Kaiser repose sur le fait que dans l'ACP, toute variable originelle apporte 1 à l'inertie. Dès lors, dans le cas de données centrées réduites, seules les composantes principales correspondant à des valeurs propres supérieures à 1 sont retenues (la valeur propre d'une composante principale exprime la part de variance qui lui est associée) puisqu'elles sont considérées comme supérieures aux variables originelles en terme de variance (Saporta, 1990). Ces composantes principales peuvent ensuite être employées dans des analyses de variance.

2.4.4.2. Méthode de classification hiérarchique (dendrogramme)

Un dendrogramme est une visualisation graphique d'une classification hiérarchique, analyse complémentaire aux méthodes d'ordination (ACP, AFC, ...). Il s'agit d'un arbre dichotomique présentant les agrégations successives de groupes à des niveaux déterminés (distance ou similarité) jusqu'à réunion en une classe unique.

Il existe plusieurs types de classification hiérarchique selon les liens utilisés: liens simples, liens moyens et liens complets. Le critère d'agrégation peut avoir beaucoup d'influence sur la classification. Cependant, il n'existe pas de méthode permettant de connaître "la" meilleure méthode d'agrégation.

Pour les analyses interspécifiques, le choix se dirige vers une classification hiérarchique à liens complets basée sur une matrice de distance euclidienne réalisée sur les données initiales transformées et standardisées. L'utilisation de liens complets a pour but de dilater l'espace entre les observations: la distance entre deux

observations est d'autant plus grande que ces observations sont différentes l'une de l'autre. La classification hiérarchique par liens complets donne ainsi lieu à des groupes bien distincts, bien séparés. La distance euclidienne étant un indice de type métrique, cette méthode respecte la proportionnalité des distances entre les objets.

Pour les analyses intraspécifiques, les données sont agglomérées selon la méthode de Ward. Il s'agit de l'une des meilleures méthodes de classification hiérarchique sur données euclidiennes. A chaque étape, la méthode de Ward consiste à choisir le regroupement tel que l'augmentation de l'inertie intraclasse soit minimale. En effet, en classification hiérarchisée ascendante, l'agrégation se fait entre les individus faisant le moins varier la variance intraclasse. En d'autres termes, à chaque pas, le but est d'obtenir un minimum local d'inertie intraclasse ou un maximum de l'inertie interclasse (Saporta, 1990). C'est exactement ce que permet d'obtenir la méthode de Ward en recourant à des ANOVA à chaque niveau. La classification hiérarchique par méthode de Ward tend à former des groupes plus homogènes en nombres d'individus.

En finalité, classification hiérarchique et ordination peuvent être combinées afin de représenter les différents groupes dans l'ordination.

2.4.4.3. Analyse de la variance multivariée

Lorsque plusieurs variables dépendantes sont analysées, l'utilisation de plusieurs tests univariés augmente le risque α (risque d'énoncer à tort une conclusion positive c'est-à-dire de conclure à une différence significative qui n'existe pas en réalité). Pour cette raison, il est indispensable d'avoir recours à des tests multivariés.

Tout comme une analyse de la variance (ANOVA) compare les différences intergroupes (b_i) aux différences intragroupes (w_i) par le biais de la statistique $F_{obs} = b_i/w_i$ pour une variable donnée (dans ce cas-ci un stérol); dans une situation multivariée, l'analyse de la variance multivariée (MANOVA) compare les différences entre les moyennes des groupes (espèce ou nature) calculées sur l'ensemble des stérols, aux différences cumulées entre les individus et les moyennes de leurs groupes respectifs, également calculées sur l'ensemble des stérols. A l'inverse des tests univariés utilisés de manière successive sur les différentes variables, la MANOVA tient compte de la corrélation entre les variables dépendantes et fait ressortir l'effet cumulatif de petites différences systématiques individuellement non significatives.

Toutefois, il faut prendre en considération que dans le cas de cette étude, la forte corrélation entre les stérols empêche d'appliquer les analyses multivariées (basées sur les variances intragroupes) directement sur les données initiales. En

conséquence, il est nécessaire d'avoir recours à une simplification des données. A cet effet, l'ACP peut être utilisée comme méthode de simplification des données (voir détails section 2.4.4.2.). Cette analyse multidimensionnelle remplace les variables initiales par un nombre (en général équivalent) de composantes principales classées par ordre décroissant d'importance. Une composante étant un ensemble de variables corrélées, les problèmes de colinéarité sont surmontés par cette méthode. Les données tant simplifiées pour rassembler l'essentiel de l'inertie, la MANOVA peut être effectuée sur le jeu de données réduit aux seules composantes principales sélectionnées selon le critère de Kaiser (voir détails section 2.4.4.2.). Ces composantes peuvent être considérées comme de nouvelles "structures de données" (Alves *et al.*, 2005).

La MANOVA est appliquée sur base du test de Wilks' Λ (le lambda de Wilks). Il s'agit du test le plus communément utilisé lorsque la variable indépendante présente plus de deux niveaux. Similaire à un pourcentage de variance non-expliquée, le lambda de Wilks est un bon compromis en terme de puissance ou robustesse. La MANOVA teste l'hypothèse nulle H_0 « il n'y a pas de différence significative dans le profil stéroïdique des différents groupe » contre l'hypothèse alternative H_1 « il y a au moins un groupe différent des autres dans au moins une structure des données ».

Outre le problème des multicolinéarités (corrélations trop élevées entre variables ; $> 0,70$), la MANOVA ne peut être appliquée que sur un jeu de données répondant aux conditions suivantes :

- échantillonnage aléatoire et indépendance des observations ;
- normalité multivariée vérifiée par le test de Mardia ;
- égalité des matrices de variance-covariance vérifiée par le test M de Box. Si les groupes sont approximativement de même taille, une violation de cette condition n'a que peu d'impact sur les résultats ;
- linéarité entre variables dépendantes ;
- peu de valeurs extrêmes. Leur présence éventuelle est détectée à l'aide d'une boîte de dispersion (BoxPlot). Un maximum de trois valeurs extrêmes par groupes sera toléré.

2.4.4.4. Test Hotelling T^2

Cependant, dans le cas d'un rejet de l'hypothèse nulle H_0 , la MANOVA ne permet pas de déterminer quels sont les groupes qui diffèrent les uns des autres. Pour répondre à cette question, il faut avoir recours à un test *post-hoc* tel que le test de Hotelling T^2 . Le test Hotelling T^2 est l'équivalent du test de *t*-student en analyse univariée et teste l'hypothèse nulle H_0 « les deux groupes sont égaux » contre

l'hypothèse alternative H_1 « les deux groupes diffèrent dans au moins une structure des données ». Le test est ainsi réalisé pour tous les couples des différents groupes, permettant de localiser la ou les différences entre les groupes. Outre la linéarité entre variables dépendantes et la limitation des valeurs extrêmes, les postulats de départ sont identiques à ceux de la MANOVA mentionnés ci-dessus.

2.4.4.5. Tests univariés

Bien que la MANOVA et le test Hotelling T^2 permettent de détecter la présence de différences significatives, aucune justification quant à ces différences observées n'est fournie. De ce fait, les conclusions qui en sont tirées peuvent faire pâle figure. Afin de compléter les résultats de ces tests, d'autres analyses sont donc nécessaires.

Dans le cas d'une différence significative détectée entre deux groupes, des tests t de Student indépendants (comparaison de deux moyennes) sont effectués pour tous les stéroïdes. Chaque test t de Student mené pour chacun des stéroïdes teste l'hypothèse nulle H_0 « les deux groupes ont la même teneur moyenne en ce stéroïde particulier » contre l'hypothèse alternative H_1 « les deux groupes ont une différence significative en ce qui concerne la teneur moyenne en ce stéroïde ». Dans le cas de tests indépendants, il n'y a pas d'appariement des données et les effectifs de chacun des groupes ne sont pas nécessairement égaux.

S'agissant d'un test paramétrique, le test t de Student requiert des postulats de départ :

- échantillonnage aléatoire et indépendance des observations ;
- distribution normale des observations pour la variable quantitative intéressée (distribution t de Student lorsque l'effectif est petit et que la distribution de la population d'où est issu cet échantillon est normale) vérifiée à l'aide d'un graphe quantile-quantile (QQ-Plot);
- homoscedasticité (égalité des variances intragroupes) vérifiée par le test de Bartlett.

Dans le cas où les observations ne suivent pas une distribution t de Student, le choix se dirige vers le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, équivalent non paramétrique du test t de Student qui n'utilise pas de distribution statistique des données. Au lieu de comparer les moyennes, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney compare la position de toutes les observations les unes par rapport aux autres ; ce qui équivaut à comparer la position des médianes entre les deux groupes considérés. Il teste l'hypothèse nulle H_0 « les deux groupes ont la même teneur en ce stéroïde particulier » contre l'hypothèse alternative H_1 « les deux groupes ont une différence significative en ce qui concerne la teneur en ce stéroïde ». Il est à remarquer que dans le cas de nombreux ex aequo, le test perd de sa robustesse.

Si la distribution des données suit la distribution théorique mais qu'il n'y a pas d'homoscédasticité, le choix est orienté vers un test t de Student à variances inégales dont le calcul est légèrement différent du test t de Student à variances égales effectué lorsque toutes les conditions sont remplies. Quelque soit la variante du test t de Student (variances égales ou inégales), le calcul du test est optimisé.

2.4.4.6. Démarche statistique

Une analyse en composantes principales (ACP) est exécutée sur les données initiales standardisées (centrées-réduites). Pour la sélection du nombre de variables de synthèse à retenir, la réduction du nombre d'axes est effectuée selon le critère de Kaiser. En fonction du nombre de niveaux de la variable qualitative, cette ordination est éventuellement combinée à une classification hiérarchique.

Une analyse multivariée de la variance (MANOVA) et un test *post hoc* Hotelling T^2 sont alors menés sur le jeu de données réduit aux seules composantes principales sélectionnées afin d'évaluer la significativité des différences entre les espèces ou entre les matrices (pollen, pain, larve, femelle et mâle). Une série de tests univariés permet par la suite d'identifier les composés stéroïdiques individuels ayant une différence significative entre les groupes pris 2 à 2 (Fig.39).

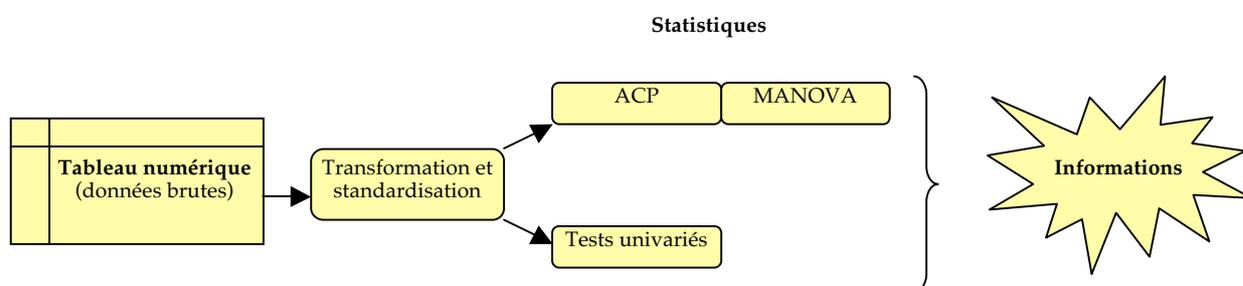


Figure 39: Schéma représentant la démarche statistique suivie lors des différentes analyses.

2.4.4.5. Logiciel

Outre les tests *post-hoc* qui ont nécessité une version plus récente du logiciel R (version 2.9.1), les différents tests statistiques utilisés au cours de ce travail ainsi que les graphes présentés ont été performés au sein du logiciel R (version 2.2.1) SciViews (version 0.9.2). Les scripts des différentes analyses sont détaillés dans l'annexe 3.

3. Résultats

3.1. Observations éthologiques sur le terrain

Alors que la collecte s'est effectuée fin de matinée et début d'après-midi les 17 et 18 avril 2008, période de la journée où les deux espèces devraient être en pleine phase de récolte (Bischoff *et al.*, 2003), une différence d'activité a pu être observée entre les femelles des deux espèces. Pendant que *Colletes cunicularius* volait en tout sens avec les scopae remplies de pollen, les andrènes restaient inertes au sol, exemptes de toute charge de pollen. Cette absence d'activité n'a été observée qu'au sein de la Grande Bruyère de Blaton (première station) et semble être corrélée avec la fin de floraison du saule. En effet, là où la plante hôte était en pleine floraison, les femelles d'*Andrena vaga* effectuaient de nombreux voyages, collectant le pollen en grande quantité.

3.2 Analyses palynologiques

3.2.1. Grande-Bruyère de Blaton

Toutes les cellules de *Colletes cunicularius* analysées (n=10) sont exclusivement composées de *Salix* sp. pur (100%). Par contre, des types de pollen autres que le saule ont été trouvés dans les charges transportées par les femelles à un moment plus avancé de leur phénologie (Fig.42). La figure 44 illustre le détail de l'analyse du pollen transporté par les différentes femelles collectées (n=10): les charges de deux femelles contiennent une majorité de pollens d'arbres fruitiers cf. *Prunus* sp. (>99%) (Fig.40) et une charge contient à la fois des pollens de *Salix* sp. et de cf. *Prunus* sp. dans une proportion 80:20. Le pourcentage moyen de ce pollen fruitier étant supérieur à 4% (Fig.42 indiqué par (*)), il ne s'agit pas d'un dépôt accidentel de ce pollen entomophile sur les fleurs de saule par le vent ou d'autres insectes, ce pollen a donc été collecté de manière active par l'abeille (Müller, 1996b). Les sept charges investiguées restantes contiennent majoritairement du *Salix* sp. et d'autres pollens en trace tels que le bouleau (*Betula pendula*), le tussilage (*Tussilago farfara*) et le pissenlit (*Taraxacum* sp.) considérés comme contaminants (<1%) (Fig.44).

Les charges de pollen transportées par les femelles d'*Andrena vaga* contiennent une nettement moindre proportion de pollens étrangers par rapport à *Colletes cunicularius*. Dans six des dix charges analysées, nous avons trouvé des traces d'autres types de pollen à l'état isolé: *Prunus* sp., *Betula pendula* et du *Tussilago farfara*. Vu leur très faible densité (1 à 2 sur 10.000), on peut considérer cela comme une contamination. Les quatre autres charges sont composées de *Salix* sp. pur (Fig.41). En ce qui concerne l'analyse des pains de pollen, outre les contaminants

(bouleau, tussilage, pissenlit, cardamine (*Cardamine pratensis*) et Fabaceae), ils se composent exclusivement de pollen de saule (Fig.43). Les femelles d'*Andrena vaga* récoltent donc exclusivement du *Salix* sp. quelque soit la période de leur phénologie considérée.

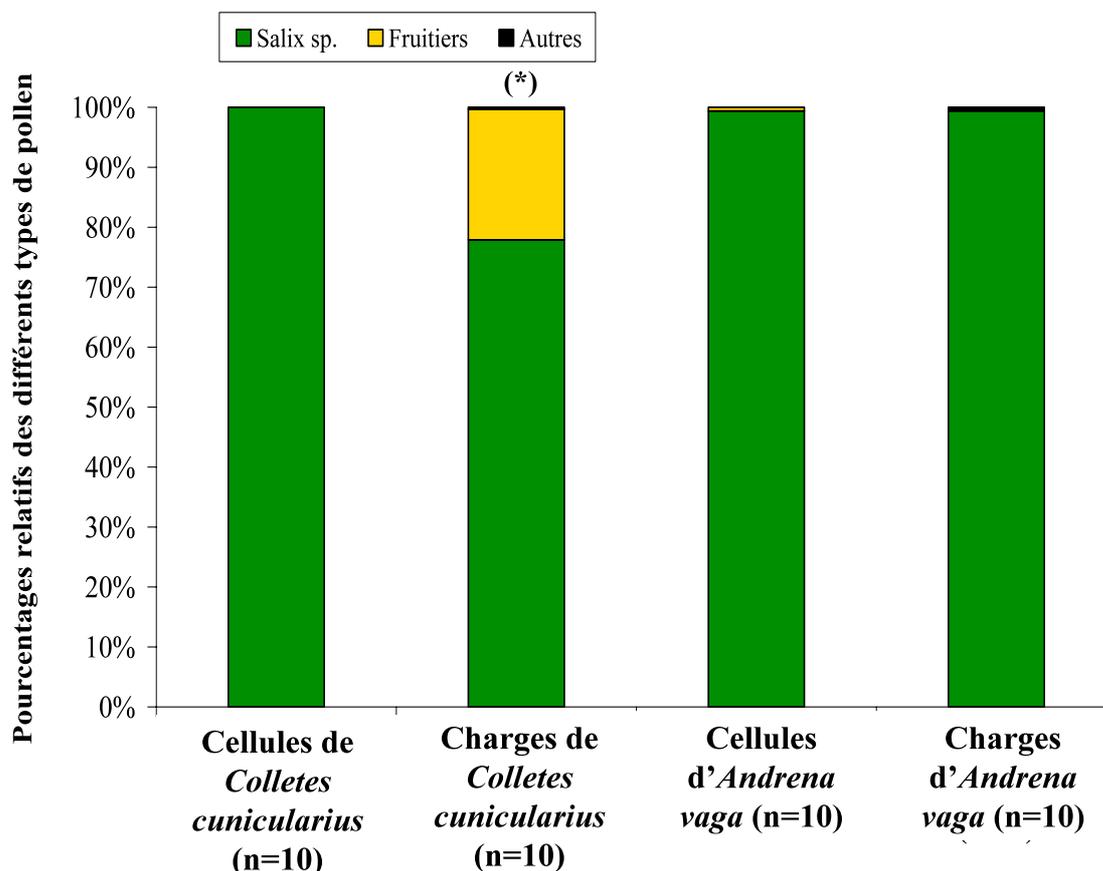


Figure 42: Pourcentage numérique relatif moyen du pollen de *Salix* sp. et des autres types de pollen dans les cellules larvaires excavées (n=10) et les charges des femelles (n=10) pour chacune des deux espèces collectées en 2008. La catégorie autres reprend les types de pollen présents en trace et en proportions variables: *Betula pendula*, *Tussilago farfara*, *Taraxacum* sp., *Cardamine pratensis* et *Fabaceae*. L'astérisque (*) indique la série d'échantillons pour laquelle la proportion de pollen autre que le saule est significative (>4%).

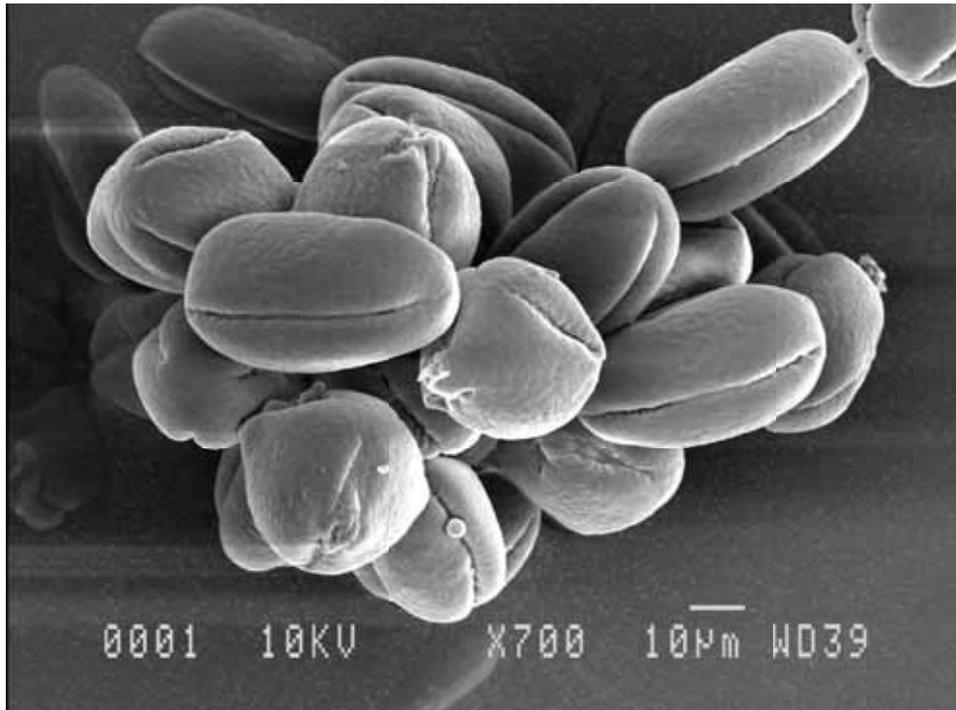


Figure 40 : Vue au microscope électronique à balayage de grains de pollen d'arbres fruitiers cf. Prunus sp. prélevés sur les charges scopales d'une femelle de Colletes cunicularius (Photographie de P. Postiaux).

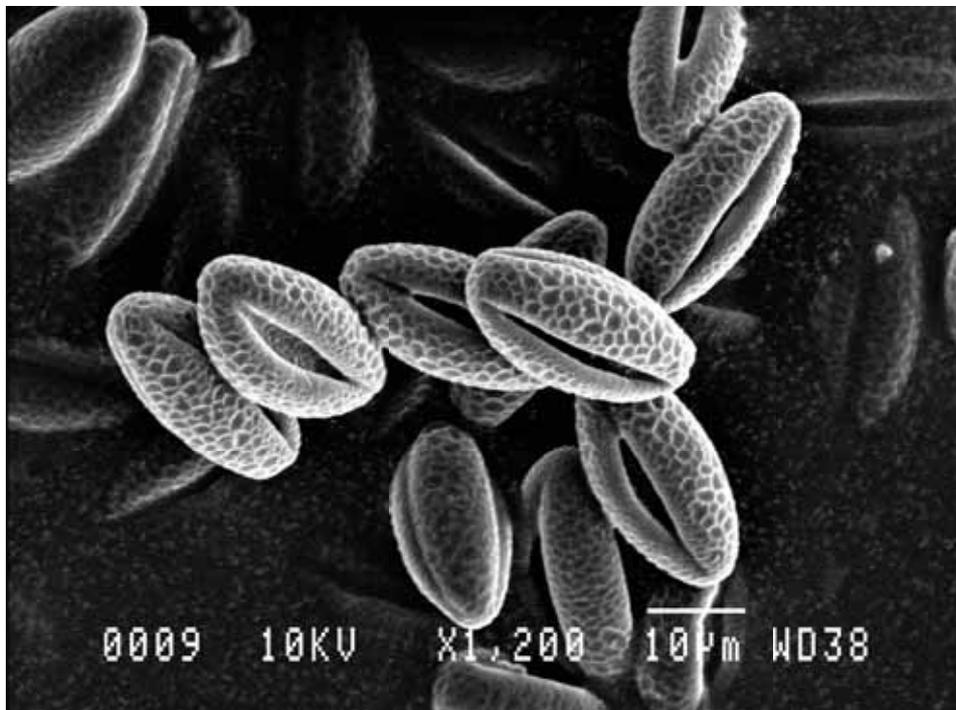


Figure 41 : Vue au microscope électronique à balayage de grains de pollen de Salix sp. prélevés sur les charges scopales d'une femelle d'Andrena vaga (Photographie de P. Postiaux).

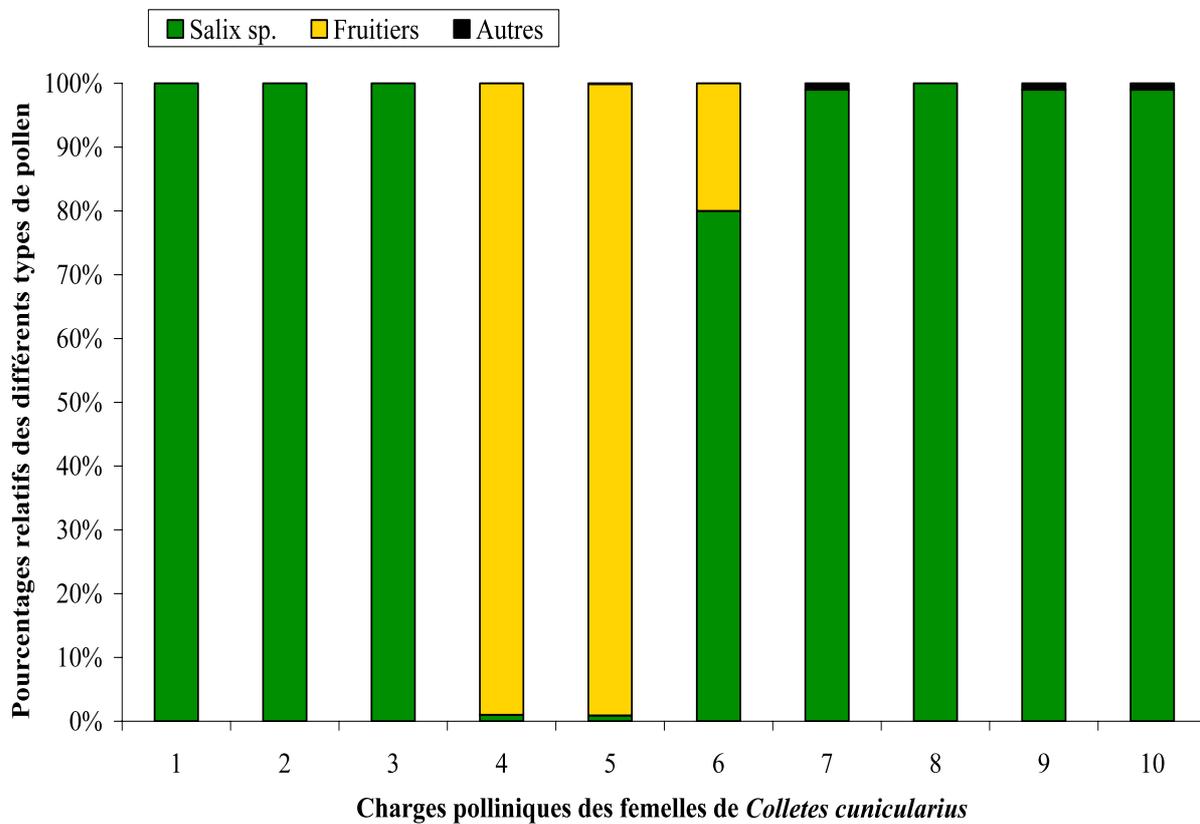


Figure 44: Pourcentage numérique relatif du pollen de *Salix sp.* et des autres types de pollen dans les charges de chacune des dix femelles de *Colletes cunicularius* collectées en 2008.

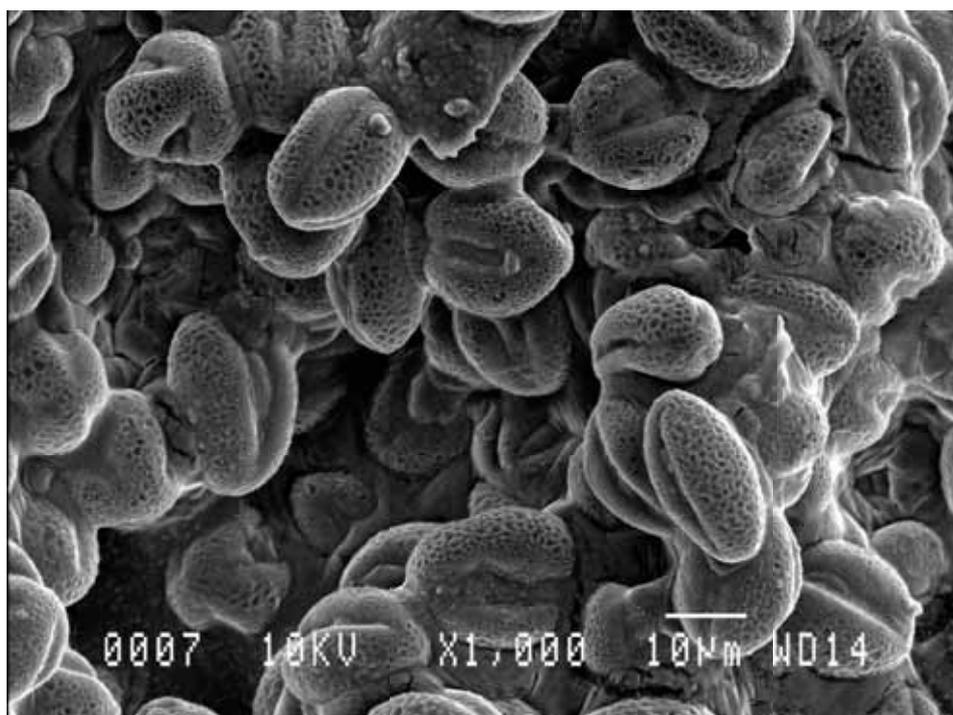


Figure 43 : Vue au microscope électronique à balayage du mélange de nectar et de grains de pollen de Salix sp. composant les pains de pollen des larves d'Andrena vaga (Photographie de P. Postiaux).

3.2.2. Dunes de Pont-Mahé

Toutes les cellules de *Colletes cunicularius* analysées (n=28) sont composées d'un mélange de pollen de *Salix* sp. et de pollen d'arbres fruitiers cf. *Prunus* sp. dans des proportions variables. Certaines cellules larvaires contiennent une proportion dominante de cf. *Prunus* sp. tandis que d'autres sont à dominante saule. Après un balayage systématique des différentes lames, cinq échantillons contenant une majorité de pollens d'arbres fruitiers cf. *Prunus* sp. ont été sélectionnés.

Le pourcentage de pollen fruitier étant supérieur à 4% dans chacune des cinq cellules larvaires investiguées plus minutieusement (Fig.45), il ne s'agit pas d'un dépôt accidentel mais d'une collecte active par l'abeille (Müller, 1996b).

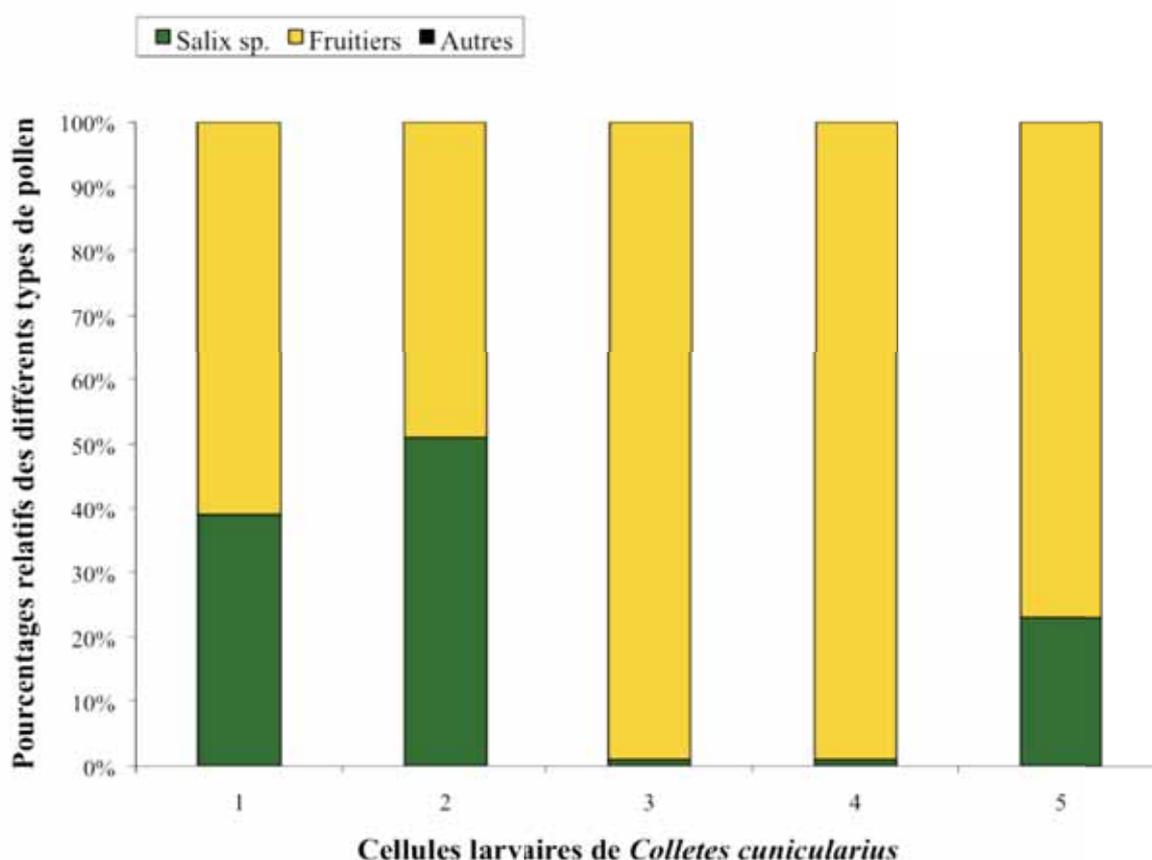


Figure 45: Pourcentage numérique relatif du pollen de *Salix* sp. et des autres types de pollen dans cinq des cellules larvaires de *Colletes cunicularius* collectées en avril 2009.

Les analyses microscopiques de ces cellules larvaires confortent les résultats rencontrés précédemment.

3.3 Analyses stéroliques micro-quantitatives

3.3.1. Adaptation de la méthode d'analyse des stérols de Lognay *et al.* (1989, 1992)

Tous les réactifs et solvants utilisés sont de qualité « pour analyse ».

3.3.1.1. Préparation de l'échantillon

Pollen scopal et floral

Avant saponification, le matériel lyophilisé est décongelé et homogénéisé dans un mortier. Il est ensuite scindé en plusieurs échantillons de 20 mg (quantité optimale déterminée suite à des tests de dose).

Pain de pollen

Avant saponification, le matériel lyophilisé est décongelé et homogénéisé dans un mortier. Pour *Colletes cunicularius*, le pain solide doit être préalablement débarrassé du cellophane à l'aide d'une pince fine. Si le cellophane reste soudé au pain, une étape supplémentaire de vortexage dans du méthanol permet de désolidariser le mélange nectar-pollen des membranes de cellophane qui sont alors récupérées à l'aide d'une pince fine. Une fois sèches, elles sont à leur tour pesées afin de déterminer le poids exact de l'échantillon par soustraction. Le méthanol est évaporé sous azote après élimination des membranes.

Une fois les échantillons pesés avec précision, ils sont à nouveau homogénéisés dans du KOH méthanolique 2N. Chaque échantillon est traité dans son entièreté.

Larves

Avant saponification, les larves décongelées sont débarrassées de leur tube digestif et de leur cuticule. Les échantillons sont pesés avec précision puis broyés dans le KOH méthanolique 2N. Chaque échantillon est traité dans son entièreté.

Adultes

Avant saponification, les adultes décongelés sont débarrassés de leurs pattes et de leurs ailes. Les échantillons sont pesés avec précision puis broyés dans le KOH méthanolique 2N. Chaque échantillon est traité dans son entièreté.

3.3.1.2. Saponification

Les échantillons sont saponifiés en présence de 2,5 ml de KOH méthanolique 2N à 80°C pendant 1 heure au bain marie. Après refroidissement et addition du standard interne à raison de 1ml par échantillon, les solutions sont diluées avec 2,5 ml d'eau MilliQ.

Concentration du standard interne (optimisée suite à divers tests) :

Pollen (20 mg) : 0,05 mg/ml

Pain de pollen : < 50 mg: 0,05 mg/ml

> ou = 50 mg: 0,25 mg/ml

Larves : 0,05 mg/ml

Adultes : 0,05 mg/ml

3.3.1.3. Extraction

Ces solutions hydroalcooliques sont extraites 3 fois avec 5 ml d'éther diéthylique. Cette opération terminée, les extraits étherés (transparents au jaunâtres dans le cas des pollen et pains de pollen) contenant l'insaponifiable sont lavés avec 3 fois 5 ml d'eau MilliQ.

3.3.1.4. Chromatographie sur couche mince

Chaque extrait étheré est séché par filtration sur Na₂SO₄ anhydre, concentré sous vide, repris par 0,5 ml de chloroforme puis fractionné par chromatographie préparative sur couche mince.

L'échantillon d'intérêt est déposé de façon linéaire sur la couche de silice avec de part et d'autre des spots de référence (mélange cholestérol bétuline à forte concentration) déposés à une distance empêchant toute contamination de l'échantillon.

Après élution (éluant : chloroforme / éther diéthylique / ammoniac 90 : 10 : 0,5 v/v/v), les plaques sont révélées par pulvérisation de 2,7-dichlorofluorescéine à 0,2% dans l'éthanol suivie d'un examen sous U.V. (254 nm). Les bandes correspondant aux stérols (R_f = 0,45) sont récupérées par grattage et les stérols réextraits trois fois avec respectivement 5 ml, 3 ml et 3 ml de chloroforme. Le solvant est ensuite éliminé une première fois par évaporation sous vide. L'échantillon est repris par 1ml de chloroforme et filtré sur une bourre de laine de verre rincée par 0,5ml de chloroforme. Cette étape de filtration permet l'élimination des particules de silice présentes dans l'échantillon qui s'accumulent dans le press-fit lors des injections entraînant une perte du rapport cholestérol / bétuline. Le solvant est alors éliminé une seconde fois par évaporation sous azote. Les stérols obtenus sont silylés.

3.3.1.5. Silylation

La réaction est effectuée pendant 30 minutes à 90°C en présence de 100 µl d'un mélange 1 :1 v/v de pyridine anhydre et du réactif de silylation (BSTFA+1% TMCS : bis-silyltrifluoroacétamide contenant 1% de triméthylchlorosilane). Les échantillons sont évaporés sous azote et repris par du n-hexane. Ils peuvent ensuite être analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

Volume de reprise du n-hexane :

Pollen (20 mg) : 200 µl

Pain de pollen : le volume de reprise doit être adapté au poids de l'échantillon et est calculé comme suit :

$$\text{volume de reprise (ml)} = \frac{\text{poids de l'échantillon (mg)}}{100}$$

Larves : 200 µl, quel que soit le poids.

Adultes : 200 µl, quel que soit le poids

3.3.1.6. Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

Les stéroïdes détectés sont identifiés par comparaison des temps de rétention et des temps de rétention relatifs (calculés par rapport au β-sitostérol-TMS) avec ceux de l'huile de tournesol prise comme référence (composition connue avec certitude). L'huile de colza permet quant à elle d'identifier le brassicastérol selon la même technique.

Conditions d'analyse :

Pains de pollen :

Colonne	VF-5ms (30 m, 0.25 mm ID, df=0.25 µm)
Injecteur	« On-column » AS-2000 (ThermoFinnigan)
Température	60°C (1 min) jusque 285°C (30°C/min) suivi d'un isotherme à 285°C (32 min)
Gaz vecteur	Helium 90KPa
Appareil	GC-8000 Top series (ThermoQuest)

Les pains de pollen constituent les premières analyses de ce travail. Par la suite, il s'est avéré que l'utilisation d'un bref plateau isotherme de plus haute température en fin d'injection augmentait la résolution de la bétuline. Pour cette raison, l'injection des autres échantillons a été effectuée selon un programme de températures différent.

Autres :

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

Les facteurs de réponse relatifs cholestérol/bétuline obtenus par le FID (flame ionization detector) sont utilisés pour calculer les teneurs des autres molécules (Lognay *et al.*, 1995).

3.3.1.7. Analyse GC-MS

Afin de vérifier les identifications effectuées à partir des données de rétention mesurées en CPG, les échantillons sont soumis à une analyse en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS). Les profils de fragmentation sont comparés à la librairie de spectrométrie de masse NIST/EPA/NIH version 1.7.

Conditions d'analyse :

Colonne	OPTIMA-5ms (30 m, 0.32 mm ID, df=0.25 µm)
Injecteur	Splitless à 280°C
Température	60°C (1 min) jusque 290°C (30°C/min) suivi d'un isotherme à 290°C (32 min)
Gaz vecteur	Helium
Appareil	TRACE GC-MS 2000 series (ThermoFinnigan) Température interface : 320°C-70eV Gamme de masse : 45 - 600 a.m.u.

3.3.2. Analyses stéroliques

3.3.2.1. Chromatogrammes et caractérisation des profils stéroliques

Au cours de cette étude, 82 échantillons ont été analysés. Sur base des chromatogrammes obtenus grâce à l'analyse par CPG, les profils stéroliques ont été décrits pour chacun des échantillons (quantifications relative et absolue pour chaque composé détecté entre le cholestérol et la bétuline). Toutes espèces et matrices confondues, 10 composés stéroliques ont été détectés. Les tables de composition stérolique ainsi que les chromatogrammes représentatifs pour chacune des matrices sont repris ci-dessous pour les espèces étudiées (Tab.2, 3 et 4 ; Fig.46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 et 56).

3.3.2.1.1. Pollen floral de *Salix sp.*

Salix sp. est l'unique arbre en fleur butiné par *Andrena vaga* et préférentiellement butiné par *Colletes cunicularius*. La teneur en stérols totaux du pollen de saule est de 12,37 mg/g de matière lyophilisée.

Le stérol majeur est un composé encore indéterminé à l'heure actuelle sortant au temps de rétention relatif 1,23 (Fig.46). Outre cette inconnue, les stérols les plus représentés sont des stérols à 29 carbones. Soit principalement le β -sitostérol (24,89 %) et le Δ 5-avénastérol (21,56 %). La fraction campestérol/24-méthylènecholestérol représente 3,12 % des stérols totaux. Le pourcentage des composés mineurs non identifiés est de 6,62 % des stérols totaux (Tab.2).

Table 2 : Composition stérolique du pollen de saule. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (> 5 %). L'analyse a été effectuée sur cinq échantillons de pollen de saule. (ML, matière lyophilisée. N.I., somme des composés mineurs non identifiés. Inconnue, composé majeur non identifié. 24-Méth.Chol. + Camp., 24-méthylène cholestérol + campestérol).

Stérols	Pollen		
	Xmax	Xmin	X \pm sd
Cholestérol	0,81	0,56	0,71 \pm 0,10
24-Méth.Chol.+Camp.	3,87	2,81	3,12 \pm 0,43
Stigmastérol	0,16	0,13	0,14 \pm 0,01
β -Sitostérol	25,53	24,19	24,89 \pm 0,54
Δ 5-Avénastérol	22,18	20,91	21,56 \pm 0,53
Cholesténone	1,3	1,03	1,12 \pm 0,11
Δ 7-Stigmastérol	3,21	1,68	2,3 \pm 0,58
Δ 7-Avénastérol	0,76	0,64	0,68 \pm 0,05
Inconnue	39,8	37,98	38,86 \pm 0,80
N.I.	8,69	5,67	6,62 \pm 1,21
Teneur en stérols totaux	12592,5 μ g/g ML	12249,2 μ g/g ML	12377,69 \pm 139,33 μ g/g ML