

UNIVERSITE DE MONS
INSTITUT DES BIOSCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE



**Qualité diététique du pollen : le paradoxe
des Asteraceae**

Promoteur
Dr. Denis Michez
Co-promotrice
Dr. Maryse Vanderplanck

Mémoire de fin d'études
présenté par **Declèves Sylvain**
Master 2 en Sciences
Biologiques, option Biologie
des Organismes et Ecologie

Année académique 2013-2014

UNIVERSITE DE MONS
INSTITUT DES BIOSCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

Qualité diététique du pollen : le paradoxe des Asteraceae

Promoteur
Dr. Denis Michez
Co-promotrice
Dr. Maryse Vanderplanck

Mémoire de fin d'études
présenté par **Declèves Sylvain**
Master 2 en Sciences
Biologiques, option Biologie
des Organismes et Ecologie

Année académique 2013-2014

S. Declèves, 2014. Qualité diététique du pollen : le paradoxe des Asteraceae. Mémoire en Sciences Biologiques, option Biologie des Organismes et Ecologie. Université de Mons, 95 pp.

Résumé :

La majorité des plantes à fleurs est dépendante de vecteurs animaux pour leur reproduction sexuée. Parmi ces vecteurs, les abeilles constituent le groupe majoritaire de pollinisateurs dans les milieux tempérés. Par rapport à d'autres pollinisateurs comme les coléoptères, les abeilles présentent la particularité de dépendre exclusivement des plantes à fleurs à tous leurs stades de développement. Elles présentent différentes adaptations pour collecter activement le pollen et le nectar : morphologie, phénologie et comportement. Les abeilles sont particulièrement efficaces pour la récolte de pollen, ce qui peut être dommageable pour la plante. Par conséquent, les plantes font face à un dilemme : attirer les abeilles pour la pollinisation mais limiter l'exploitation excessive de leur pollen afin d'assurer leur reproduction. Les relations plante-abeille peuvent donc être considérées comme une exploitation mutuelle en équilibre plutôt qu'un mutualisme classique. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé différents types d'adaptations pour réduire la gamme des visiteurs se nourrissant de pollen : morphologie florale complexe ou déhiscence limitée des anthères. De plus en plus d'études suggèrent que certaines plantes présentent un pollen de faible qualité nutritionnelle et/ou toxique pour limiter les récoltes excessives.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux Asteraceae. Cette famille de plantes présente la particularité d'attirer principalement des abeilles spécialistes et peu d'abeilles généralistes pour la récolte du pollen. Ce caractère remarquable, appelé le paradoxe des Asteraceae, pourrait être lié à des adaptations particulières des abeilles spécialistes pour la digestion du pollen d'Asteraceae, caractéristiques que n'auraient pas les abeilles généralistes. Afin de caractériser la composition chimique de divers pollens, des analyses chimiques de stérols, polypeptides, acides aminés et alcaloïdes ont été effectuées sur huit espèces d'Asteraceae et neuf espèces d'autres familles visitées à la fois par des abeilles généralistes et spécialistes (Araliaceae, Boraginaceae, Ericaceae, Fabaceae, Lythraceae, Orobanchaceae, Resedaceae et Salicaceae). Dans un second temps, des élevages de micro-colonies de bourdons (*Bombus terrestris*) ont été réalisés dans le but d'évaluer l'impact d'une diète à base de pollen d'Asteraceae sur une abeille généraliste.

Les résultats confirment l'existence d'une variabilité chimique de la composition du pollen en fonction de l'espèce et ce, même au sein d'une famille donnée. Les Asteraceae sont caractérisées par une abondance plus faible des composés stéroliques connus pour être bénéfiques pour les bourdons. Elles sont à l'inverse caractérisées par la présence de cholestérol, cholesténone ou $\delta 7$ -stérols. Elles présentent également des taux en acides aminés essentiels et en polypeptides plus faibles ainsi qu'une mauvaise digestibilité. La présence de composés secondaires de type alcaloïdes ne semble par contre pas être une signature chimique propre à cette famille. Parallèlement, l'élevage des micro-colonies confirme le caractère inadéquat du pollen d'Asteraceae. Les comparaisons des dynamiques de développement des micro-colonies sur les différentes diètes indiquent que le contenu en polypeptides ainsi que la présence d'alcaloïdes ne sont pas à l'origine du mauvais développement sur la diète de *Cirsium* sp. Par contre, il pourrait être la conséquence de la présence de $\delta 7$ -stérols ainsi que de la mauvaise digestibilité de ce pollen. La piste de la présence d'autres composés secondaires n'est toutefois pas à exclure, en particulier les saponines.

Mots clés : Asteraceae – *Bombus terrestris* – Polylectisme – Pollen – Défense chimique – Digestibilité

Remerciements

A travers ces quelques lignes, je tiens à remercier celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à ce présent travail.

Tout d'abord, je remercie le Prof. Pierre RASMONT de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que de m'avoir fourni la logistique nécessaire à la réalisation de ce travail. C'est à travers son enseignement et ses anecdotes qu'il m'a transmis sa passion pour la zoologie et l'écologie.

Je tiens également à témoigner toute ma gratitude ainsi que mes remerciements envers le Dr. Denis MICHEZ pour ses conseils judicieux, sa disponibilité, ses brillantes idées, son encadrement ainsi que ses compétences et son expérience scientifique.

Je remercie tout particulièrement le Dr. Maryse VANDERPLANCK de m'avoir supervisé. Sa patience, sa pédagogie, sa jovialité, son soutien, son aide et ses compétences scientifiques m'ont été indispensables tout au long de ce travail.

Ces cinq années d'étude n'auraient eu d'égal sans la complicité des mes camarades de classe. Un grand merci à eux pour la bonne humeur, le soutien et l'aide fournis tout au long de ces années et de ce travail. A Jérôme « Bean », Lucas « Azé », Maxence « Pitch » et Maxime « Michel ».

Je tiens aussi à remercier les autres membres du laboratoire pour leur soutien, leur aide ainsi que leur bonne humeur qui m'ont permis de travailler dans la bonne ambiance au sous-sol du « chavbee ». A Maryse, Nathalie, Romain, Pierre-Laurent, Manuel, Alexandre et Jonathan. Sans oublier nos amis les « pentagoniens », Dimitri, Nicolas, Thomas et Sarah.

Je remercie les professeurs de m'avoir ouvert les portes de leur service. Je suis également très reconnaissant envers l'ensemble du corps professoral et l'Université de Mons pour la qualité de la formation reçue au cours de ces cinq années d'études.

Je tiens aussi à remercier les personnes rencontrées lors de mon séjour en Suisse pour leur accueil, mais également Mme Nathalie ESCARAVAGE et Mme Linn Cecilie KRÜGER pour leur excellent travail.

Je remercie très amicalement Mr. Albert Michez pour l'aide technique lors du prêt des ruches et des abeilles utilisées dans le cadre de cette étude.

Je tiens évidemment à remercier ma maman, sans qui tout ça n'aurait été possible, ainsi que toute ma famille et mes amis proches.

Je remercie cordialement l'ensemble des membres du jury pour leur lecture du présent travail.

Enfin, que toutes les personnes ayant contribué à l'élaboration de ce travail et qui n'ont pas été citées ci-dessus sachent que je ne les oublie pas et que je les remercie sincèrement.

Table des matières

1. Introduction	7
1.1. Ecologie et ressources alimentaires des abeilles	7
1.1.1. Généralités	7
1.1.2. Choix floraux	10
1.1.3. Ressources alimentaires : le nectar et le pollen	11
1.1.3.1. Valeurs nutritives	11
1.1.3.2. Physiologie et diététique des abeilles : besoins nutritifs	12
1.2. Plantes et abeilles : une relation particulière	15
1.3. Le paradoxe des Asteraceae	17
1.4. Objectifs	18
1.5. Modèles biologiques	18
1.5.1. Bourdon polylectique	18
1.5.2. Espèces florales pour l'étude de la composition chimique du pollen	19
1.5.3. Diètes polliniques destinées à l'élevage	23
2. Matériel et méthodes	26
2.1. Echantillonnage	26
2.2. Analyses chimiques	26
2.2.1. Les stérols	26
2.2.2. Les acides aminés totaux	28
2.2.3. Les polypeptides	28
2.2.4. Les alcaloïdes	30
2.3. Elevage	33
2.3.1. Dispositif expérimental	33
2.3.2. Conditions d'élevage	33
2.3.3. Méthode d'élevage	33
2.3.4. Paramètres considérés	35
2.4. Analyses statistiques	36
2.3.1. Analyses univariées	36
2.3.2. Analyses bivariées	37
2.3.3. Analyses multivariées	37

3. Résultats	39
3.1. Composition chimique des pollens d'Asteraceae	39
3.1.1. Composition en polypeptides et en acides aminés	39
3.1.2. Composition stérolique	43
3.1.3. Alcaloïdes	47
3.2. Développement des micro-colonies	48
3.2.1. Collectes en pollen et en nectar	48
3.2.1.1. Impact sur le bourdon polylectique <i>Bombus terrestris</i>	48
3.2.1.2. Dynamique de développement	51
3.2.1.3. Digestibilité	54
3.2.1.4. Efficacité des diètes	55
3.2.2. Composition chimique des diètes	56
3.2.2.1. Composition en polypeptides et en acides aminés	56
3.2.2.2. Composition stérolique	60
3.2.2.3. Alcaloïdes	63
4. Discussion	64
4.1. Paradoxe des Asteraceae et protection du pollen	64
4.2. Influence d'une diète riche en Asteraceae sur le développement de <i>Bombus terrestris</i>	66
4.3. Efficacité de la stratégie évolutive des Asteraceae	70
5. Conclusion	72
6. Perspectives	73
7. Bibliographie	74
8. Annexes	90

1. Introduction

1.1. Ecologie et ressources alimentaires des abeilles

1.1.1. Généralités

Les insectes sont de loin les plus importants animaux pollinisateurs et parmi eux, les abeilles constituent le groupe de pollinisateurs le plus spécialisé et le plus important (Ollerton *et al.*, 2011). Probablement originaires d'Afrique, elles seraient apparues au Crétacé moyen parallèlement à la diversification des plantes à fleurs (Danforth *et al.*, 2006 ; Michez, 2007 ; Cardinal & Danforth, 2013).

Appartenant à l'ordre des Hyménoptères et au sous-ordre des Apocrites, ces insectes font partie de la superfamille des Apoïdea comprise dans le groupe des Aculéates. Cette superfamille inclut deux lignées : les Sphéciformes (guêpes sphécoïdes) et les Apiformes (abeilles) (Michener, 2007 ; Sharkey, 2007).

Les abeilles se répartissent actuellement en 7 familles incluant près de 1200 genres et 20000 espèces (Engel, 2005 ; Michener, 2007 ; Engel, 2011). Ces familles sont réparties en deux groupes : les abeilles à longue langue d'une part (Apidae et Megachilidae), et les abeilles à langue courte d'autre part (Andrenidae, Colletidae, Halictidae, Melittidae et Stenotritidae) (Fig. 1) (Danforth *et al.*, 2006).

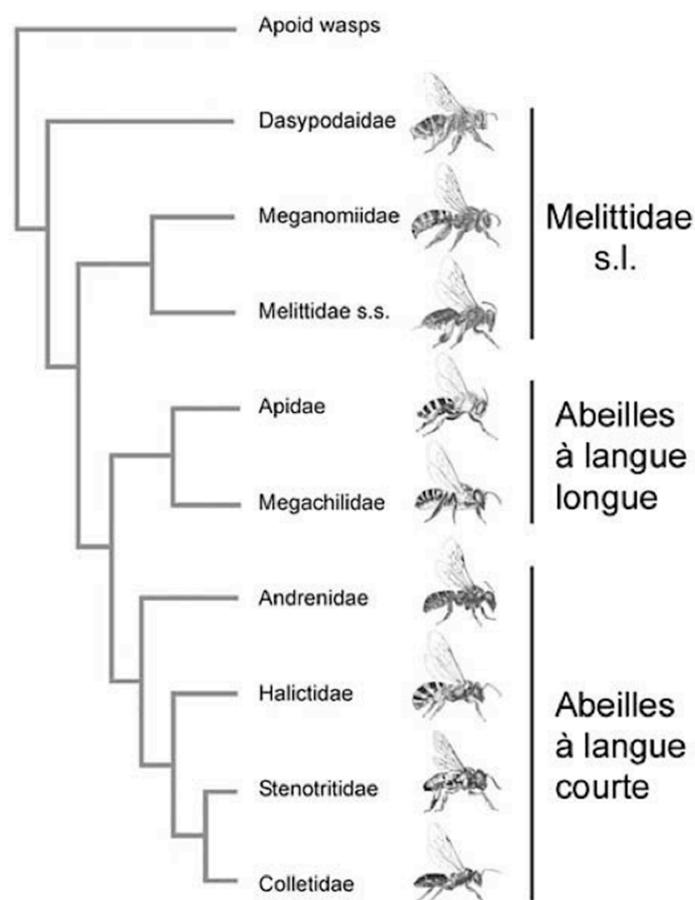


Figure 1. Phylogénie des Apoïdea Apiformes sur base de la morphologie des adultes et du séquençage de cinq gènes (d'après Danforth *et al.*, 2006).

Contrairement aux idées reçues, la majorité des abeilles présentent un mode de vie solitaire (Michener, 2007). La femelle fécondée construit son propre nid de manière isolée. Elle y accumule des ressources pour sa descendance avant d'y pondre ses œufs. Les provisions larvaires sont généralement constituées d'un mélange de nectar et de pollen formant une sorte de pâte placée dans chaque cellule pour l'alimentation des larves. Selon l'espèce, le nid est construit dans des tiges creuses (rubicoles) ou dans le sol (terricoles) voire dans d'autres matériaux comme les coquilles d'escargots pour *Osmia bicolor* (Fig. 2) (Pouvreau, 2004).

Dans ce mode de vie solitaire, il n'existe aucune division du travail, ni aucun contact entre les générations bien que des phénomènes d'agrégation, ou bourgades, se rencontrent chez certaines familles (i.e. Andrenidae, Colletidae) lorsque les conditions favorables à l'établissement du nid sont concentrées sur une petite surface (Pouvreau, 2004).

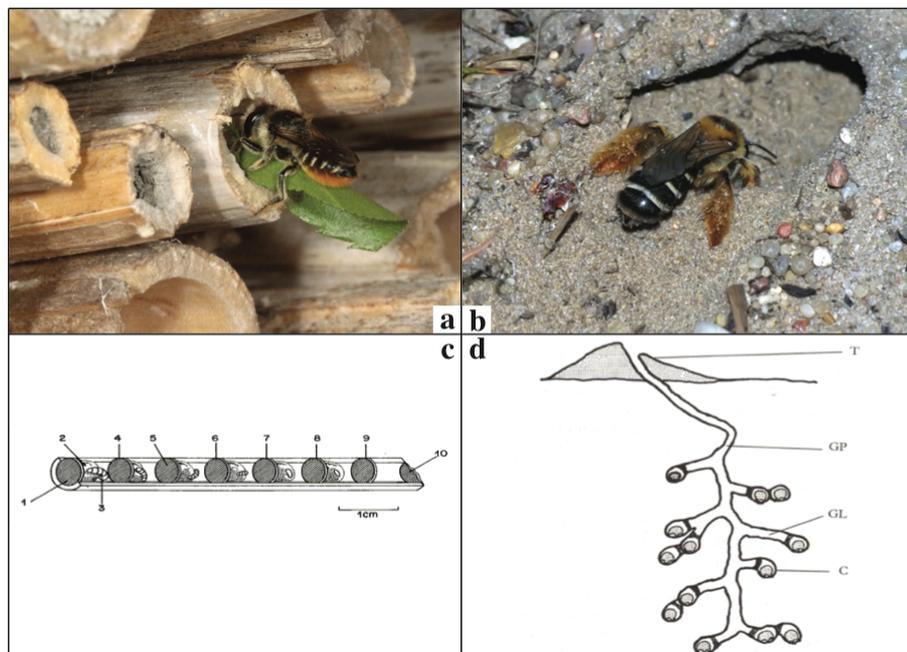


Figure 2. Nids d'abeilles solitaires. **a.** Espèce épigée rubicole (Megachilidae) (Bárbol). **b.** Espèce hypogée terricole (Melittidae) (C. Fischer). **c.** Détail du nid de mégachile dans une portion de bambou évidé dont la moitié supérieure a été enlevée afin de montrer l'agencement des cellules. (1) bouchon initial constitué de pâte d'origine végétale, (2) provision de nectar et de pollen, (3) larve plus âgée, (4-9) cloisons successives édifiées au fur et à mesure de l'achèvement des autres cellules. La dernière cellule non approvisionnée sert de vestibule protecteur et est obturée par un bouchon terminal (10) (Tasei, 1984). **d.** Détail du nid de dasypode dans le sol. (C) Cellule, (GL) Galerie latérale, (GP) Galerie principale, (T) Tumulus (Pouvreau, 2004).

Alors que le mode de vie prédominant est le mode de vie solitaire, la socialité est apparue dans deux familles d'abeilles : les Apidae (Michener, 2007) et les Halictidae (Danforth *et al.*, 2008 ; Timmermann & Kuhlmann, 2008). Impliquant la collaboration de minimum deux individus, les membres de la colonie vivent dans un même nid (Michener, 2007). Généralement, les abeilles d'une colonie peuvent être divisées en trois castes : la reine, les ouvrières et les mâles (e.g. abeilles mellifères et bourdons). Dans ce cas, une division du travail ainsi qu'un contact entre les générations existent.

Chez les bourdons, le comportement social est qualifié de primitif. En effet, le cycle présente une phase solitaire. Sous nos latitudes, les bourdons présentent un cycle annuel (Fig. 3) (Alford, 1975). La jeune reine fécondée émerge au retour de la bonne saison. Cette période varie selon les espèces mais correspond pour la plupart au début du printemps. La reine se met alors en quête d'un abri pour fonder sa colonie. Dans ce nid, généralement un terrier de petit mammifère (Djegham *et al.*, 1994), elle accumule du pollen et du nectar (i.e. pain de pollen). Une fois un pain formé, elle y pond ses œufs. La jeune reine maintient alors sa progéniture à la bonne température tout en se nourrissant du nectar de son pot à miel. Une fois les premières ouvrières émergées, la reine ne fera plus que pondre. Les ouvrières se chargent alors de s'occuper du couvain et de la récolte des ressources en vue de nourrir les futures larves.

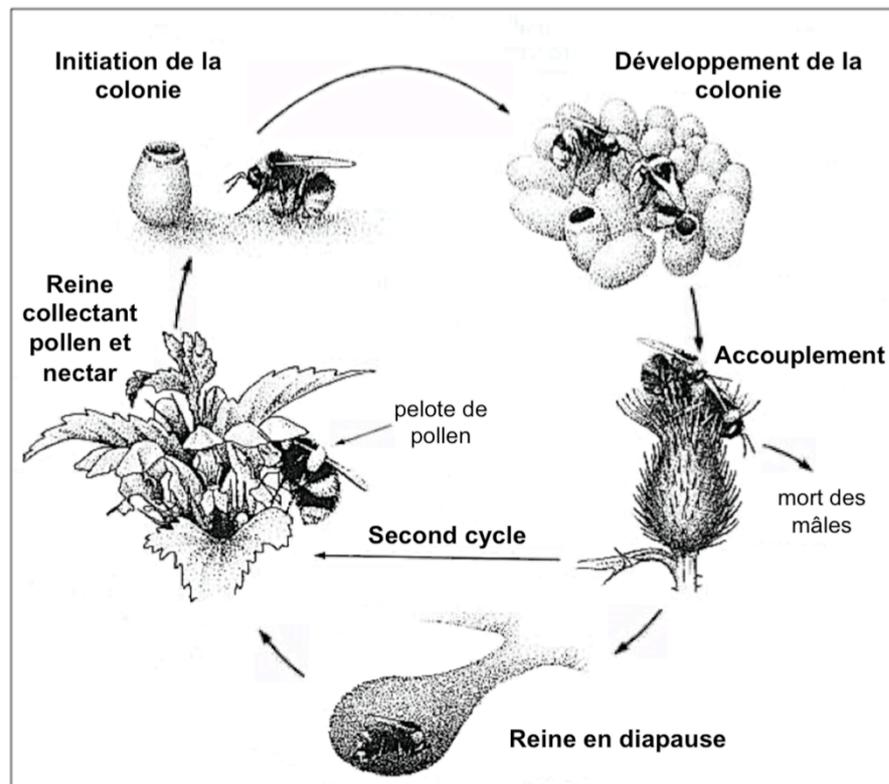


Figure 3. Cycle de vie d'une colonie de bourdons terrestres, *Bombus terrestris* L. (d'après Prys-Jones & Corbet, 1991).

Les ouvrières sont également capables de pondre. Cependant, la reine inhibe leurs ovarioles grâce à l'hormone juvénile (Alaux *et al.*, 2007). Elle garde ainsi le contrôle de sa colonie. Une fois sa spermathèque vide, elle pond des œufs non fécondés qui donneront des mâles, individus haploïdes. Avec l'accroissement de la colonie, cette hormone se dilue et perd de son efficacité. De plus en plus d'ouvrières se mettent alors à pondre. La colonie entre ainsi dans la phase de compétition, marquant la fin de la dominance de la reine. Parallèlement, certaines larves recevant une quantité de nourriture plus importante deviendront des reines.

A la fin de l'été, tous les membres de la colonie meurent sauf les nouvelles reines qui, après une phase d'accouplement, cherchent un abri pour entrer en diapause et y passer l'hiver.

1.1.2. Choix floraux

Les abeilles sont des insectes phytophages se nourrissant exclusivement des ressources offertes par les plantes, le nectar et le pollen principalement. Elles présentent d'ailleurs diverses adaptations pour collecter et digérer le pollen et le nectar : morphologie (e.g. Thorp, 2000 ; Pouvreau, 2004 ; Michener, 2007), phénologie (e.g. Michez *et al.*, 2008), comportement (e.g. Harder & Barrett, 1993 ; Throp, 2000 ; Pouvreau, 2004 ; Michener, 2007) et physiologie (e.g. Roulston & Cane, 2000).

Certaines caractéristiques florales sont connues pour attirer les abeilles (Kevan & Baker, 1983). Parmi les traits floraux, les signaux olfactifs et visuels émis par les plantes hôtes sont certainement les premiers facteurs pouvant influencer les choix floraux des abeilles et de manière plus générale, les interactions plantes-pollinisateurs (e.g. Gumbert, 2000 ; Goulson, 2010). En effet, l'attractivité de certains parfums floraux et leur impact sur le comportement de visite des abeilles ont déjà été mis en évidence dans la littérature (Dötterl *et al.*, 2005). D'un point de vue visuel, la couleur des fleurs (Briscoe & Chittka, 2001) ainsi que leurs morphologies (Dötterl & Vereecken, 2010) peuvent avoir une importance non négligeable dans les processus de sélection des plantes hôtes. Par exemple, plusieurs études suggèrent que les bourdons préfèrent visiter de larges fleurs (Galen & Newport, 1987 ; Galen, 1989 ; Cresswell & Galen, 1991 ; Eckhart, 1991 ; Ohara & Higashi, 1994 ; Shykoff *et al.*, 1997). Parallèlement, d'autres auteurs ont montré que les fleurs de grande taille produisent plus de pollen et de nectar, ce qui pourrait en partie expliquer les préférences morphologiques florales des bourdons (Teuber & Barnes, 1979 ; Brink & De Wet, 1980 ; Stanton & Preston, 1988 ; Cresswell & Galen, 1991 ; Duffield *et al.*, 1993 ; Gomez *et al.*, 2008).

Parmi les abeilles, la gamme d'espèces florales exploitées est très variable (Michener, 2007). En termes de comportements de butinage, les abeilles se différencient par leurs choix floraux plus ou moins spécialisés (Müller & Kuhlmann, 2008). Alors que certaines arborent une spécialisation dans leur choix de pollen en visitant uniquement des espèces de plantes disponibles dans leur habitat et appartenant à un nombre limité de genres et de familles (monolectisme, oligolectisme) ; d'autres butinent un plus large éventail de plantes pouvant appartenir à de nombreuses familles différentes (mésolectisme, polylectisme) (Cane & Sipes, 2006). Quelques abeilles solitaires et presque toutes les espèces sociales sont généralistes (excepté quelques espèces comme *Bombus consobrinus* et *Bombus gerstaeckeri* ; Ponchau *et al.*, 2006). En effet, les abeilles sociales collectent du pollen et du nectar sur une longue période de l'année. Dans ce cas, la spécialisation florale leur serait défavorable étant donné que la plupart des espèces fleurissent sur une courte période de temps. Contrairement aux espèces eusociales ; les abeilles solitaires, au cycle de vie éphémère, sont le plus souvent oligolectiques. Leurs périodes d'activité sont courtes et elles exploitent donc un nombre limité d'espèces florales fleurissant à la même période et appartenant à quelques familles différentes, voire à la même famille (Michener, 2007).

Müller et Kuhlmann (2008) ont défini différentes catégories et plusieurs sous-catégories au sein du continuum de la spécialisation florale, s'étendant de la spécialisation la plus étroite au généralisme le plus large (Table 1). D'un point de vue évolutif, l'oligolectisme est considéré comme l'état ancestral chez les abeilles, les clades les plus basaux étant des spécialistes étroits bien qu'il existe quelques exemples clairs de transitions du polylectisme à l'oligolectisme (Danforth *et al.*, 2006 ; Michez *et al.*, 2008a).

Table 1. Catégories de spécialisation alimentaire chez les abeilles selon la gamme de plantes butinées (d'après Müller et Kuhlmann, 2008). s.l. = sensu lato ; s.s. = sensu stricto.

Catégorie	Sous-catégorie	Définition
Monolectisme	–	Collecte de pollen d'une seule espèce de plante
Oligolectisme	Oligolectisme étroit	Collecte de pollen de deux à plusieurs espèces de plantes d'un même genre
	Oligolectisme large	Collecte de pollen de deux à plusieurs genres appartenant à une même tribu, sous-famille ou famille
	Oligolectisme varié	Collecte de pollen de deux à plusieurs genres appartenant à deux ou trois familles
Polylectisme s.l.	Polylectisme à forte préférence	Collecte de pollen de plusieurs familles avec dominance d'un clade de plantes (famille, sous-famille, tribu, genre ou espèce)
	Mésolectisme	Collecte de pollen de plus de quatre genres appartenant à deux ou trois familles de plantes
	Polylectisme s.s.	Collecte de pollen de genres variés appartenant au moins à quatre familles de plantes

Outre ces différences de comportements alimentaires, la notion de fidélité doit également être prise en compte (Cane & Sipes, 2006). Ce terme caractérise la tendance temporaire d'un butineur à visiter successivement des plantes conspécifiques. Contrairement à la spécialisation qui caractérise uniquement l'exploitation du pollen, la constance florale peut être étendue à la collecte du nectar et des huiles florales. Ce phénomène concerne donc un choix éphémère et individuel de plante par un butineur qui peut être polylectique (Cane & Sipes, 2006). Ainsi, l'abeille mellifère est une espèce généraliste mais fidèle (Amaya-Márquez, 2009). Cette fidélité se traduit par une spécialisation temporaire et locale sur une ressource (Pouvreau, 2004 ; Amaya-Márquez, 2009).

1.1.3. Ressources alimentaires : le nectar et le pollen

1.1.3.1. Valeurs nutritives

Composé essentiellement d'eau et d'hydrates de carbone (Heil, 2011), le nectar constitue la principale source énergétique des abeilles. En plus de l'eau et des sucres, le nectar renferme d'autres composés en plus faibles proportions : acides aminés, protéines, lipides, antioxydants, ions minéraux et composés secondaires (Baker, 1977 ; Adler, 2000 ; Nicolson & Thornburg, 2007). Selon Lüttge & Schnepf (1976), ils constituent 10% du poids sec alors que la majeure partie se compose de sucres (Lüttge, 1977).

Outre le nectar, l'alimentation des abeilles repose principalement sur le pollen pour des composés tels que les protéines, l'azote, les acides aminés (sous formes libre ou protéique), l'amidon, les lipides (e.g. stérols), les vitamines et les minéraux (Roulston & Cane, 2000 ; Nicolson, 2011). Parmi ces nutriments, le contenu protéique du pollen varie de 2,5 à 61% de masse sèche (Roulston & Cane, 2000). De même, la composition en acides aminés fluctue de 3,5 à 24,9% (Weiner *et al.*, 2010). A l'instar de ces classes de composés, les phytostérols (i.e. stérols retrouvés majoritairement chez les plantes) et leurs proportions relatives varient également selon la ressource (Vanderplanck, 2013). Ainsi, tous les pollens ne se valent pas d'un point de vue nutritionnel mais leur contenu varie grandement en fonction des espèces végétales (Roulston *et al.*, 2000 ; Somerville & Nicol, 2006).

1.1.3.2. Physiologie et diététique des abeilles : besoins nutritifs

De par ses apports nutritifs, le pollen joue un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques vitaux. Parmi le contenu pollinique, les stérols sont particulièrement importants car ils ne peuvent être synthétisés *de novo* par les insectes tels que les abeilles (Svoboda *et al.*, 1978) (Encadré 1). Or, ces composés stéroliques (e.g. le cholestérol) sont essentiels puisqu'ils sont des constituants des membranes cellulaires et entrent également dans divers processus comme la synthèse des hormones (i.e. les hormones de mue). Il est donc primordial que les abeilles les puisent dans leur alimentation (Clark & Bloch, 1959).

Le stérol le plus commun est probablement le cholestérol (C27) qui suffit à remplir les besoins physiologiques des insectes. Cependant, celui-ci n'est que très peu synthétisé par les plantes qui sont caractérisées par une série de phytostérols tels que le β -sitostérol (C29), le 24-méthylènecholestérol (C28) ou le campestérol (C28). Alors que le squelette carboné du cholestérol peut être utilisé tel quel par les insectes carnivores pour la synthèse d'ecdysone, la mise en œuvre de diverses adaptations est requise chez les insectes phytophages pour l'utilisation des phytostérols en tant que précurseurs hormonaux (Behmer & Nes, 2003). Différentes stratégies existent chez les phytophages : (i) la désalkylation des phytostérols à 28 ou 29 atomes de carbones en cholestérol (Svoboda *et al.*, 1978; Grieneisen *et al.*, 1993 ; Behmer & Nes, 2003), (ii) l'utilisation d'un phytostérol (C28 ou 29) comme précurseur d'une hormone de mue distincte de l'ecdysone (Behmer & Nes, 2003) et (iii) la présence d'endosymbiontes procurant les stérols nécessaires (Clayton, 1964). Tandis que les clades basaux chez les hyménoptères (e.g. symphytes) sont capables de désalkyler des phytostérols (C28 ou 29) en cholestérol (i.e. précurseur de l'ecdysone) via des voies métaboliques encore peu connues (Svoboda *et al.*, 1978; Behmer & Nes, 2003) ; d'autres hyménoptères tels que l'abeille mellifère utilisent directement les phytostérols (C28 ou C29) comme précurseur donnant lieu à des hormones de mue différentes (e.g. makistéron A et makistéron C) (Svoboda *et al.*, 1978; Feldlaufer *et al.*, 1985 ; Behmer & Nes, 2003).

Les polypeptides, essentiellement retrouvés dans le pollen, sont également des éléments nutritifs importants pour les abeilles puisqu'ils sont impliqués dans des voies métaboliques cruciales influençant le développement et la croissance des larves et des adultes ainsi que la reproduction et la longévité des individus (Roulston & Cane, 2000 ; Amdam & Omholt, 2002 ; Génissel *et al.*, 2002 ; Williams, 2003 ; Rasmont *et al.*, 2005) (Encadré 1). Bien qu'aucune étude physiologique ciblée n'ait été effectuée sur les polypeptides, ces

composés sont inclus dans la fraction protéique (i.e. polypeptides, protéines de masse moléculaire > 10000 Da). Mattila & Otis (2006) ont mis en évidence que le manque de protéines affecte la capacité des abeilles mellifères à résister aux maladies. De manière semblable, Alaux *et al.* (2010) ont démontré que le contenu protéique du pollen et la diversité de la diète influencent l'immuno-compétence de l'abeille domestique, *Apis mellifera*. Des ressources pauvres en protéines tendent à produire des abeilles plus petites que si elles s'étaient nourries de pollens plus riches en protéines (Roulston & Cane, 2002). De ce fait, la taille de la descendance est liée à la consommation totale de protéines. Bien que la concentration en protéines des grains de pollen varie de 2,5 à 60%, la majorité des espèces présentent un taux allant de 25 à 45% (Roulston & Cane, 2002).

Encadré 1. Composés nutritifs polliniques: quelques définitions

Les **stéroïdes** sont un groupe de stéroïdes appartenant aux lipides insaponifiables et caractérisés par la présence d'un groupement hydroxyle (-OH) sur le carbone 3 et d'une chaîne aliphatique de 8 à 10 carbones greffée au carbone 17. Le noyau structural est un noyau cyclopentanoperhydrophénanthrène, autrement appelé noyau stérane, et compte en tout 17 atomes de carbone. Il se compose de trois cyclohexanes (A, B, C) et d'un cyclopentane (D). Le groupement hydroxyle (a), le noyau tétracyclique (b) et la chaîne latérale (c) forment les trois domaines structuraux des stéroïdes (Behmer & Nes, 2003) (Fig. A).

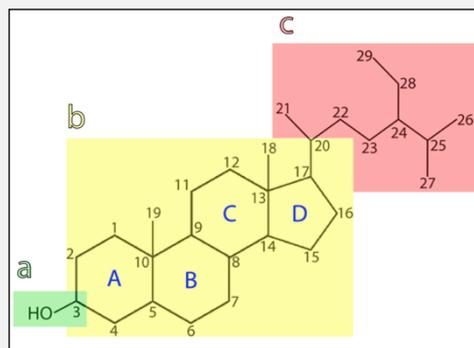


Figure A. Structure d'un stéroïde (d'après Behmer & Nes, 2003).

Les **protéines** sont des macromolécules biologiques riches en azote composées d'une ou plusieurs chaînes d'**acides aminés** liés entre eux par des liaisons peptidiques (Fig. B). La teneur en protéines brutes du pollen est déterminée sur base du contenu en azote et est, de ce fait, souvent surestimée de par la présence d'autres molécules azotées. Au sein des protéines, on distingue les **polypeptides** des **oligopeptides** sur base de la masse moléculaire, les polypeptides présentant une masse supérieure à 10000 Da (Vanderplanck *et al.*, 2014a).

Outres ces acides aminés « liés » qualifiés d'acides aminés protéiques, les acides aminés sont également présents sous forme libre; l'ensemble des deux fractions (i.e. **acides aminés protéiques et libres**) constituant les **acides aminés totaux**. Parmi eux, on distingue les **acides aminés essentiels et non essentiels** selon la capacité d'un organisme vivant à les synthétiser (De Groot, 1959). Les acides aminés se distinguent par leur chaîne latérale, R, qui peut être un simple atome d'hydrogène ou bien plus complexe (Fig. B).

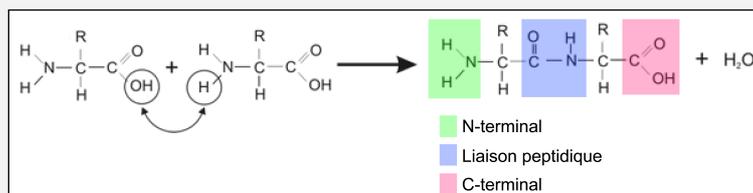


Figure B. Structure d'un acide aminé et formation du lien peptidique (Azaquar website).

Basualdo *et al.* (2013) ont mis en évidence qu'un pollen pauvre en protéines n'était pas consommé de manière plus abondante que du pollen plus riche par *Apis mellifera* (i.e. pas de compensation quantitative du contenu protéique). De même, Vanderplanck *et al.* (2014b) ont montré que la consommation du pollen par *Bombus terrestris* restait inchangée malgré des taux en polypeptides fluctuants. Les contenus protéiques et polypeptidiques des ressources ne sont donc pas compensés par une consommation accrue de pollen, entraînant un impact sur la taille de la descendance et donc sur le fitness de la colonie (Free & Butler, 1959 ; Goulson *et al.*, 2002 ; Spaethe & Weidenmuller, 2002 ; Peat *et al.*, 2005 ; Couvillon & Dornhaus, 2010 ; De Luca *et al.*, 2013). Cependant, des études récentes suggèrent qu'une augmentation de la consommation en nectar pourrait constituer une compensation partielle pour les ressources présentant une faible teneur protéique (Vanderplanck *et al.*, 2014b). Par ailleurs, outre la concentration protéique, il semblerait que la nature des protéines soit également importante pour le bon développement des abeilles (Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008a).

Bien que la valeur nutritionnelle des ressources ait longtemps été évaluée sur base de leurs contenus en protéines brutes (Day *et al.*, 1990), cette évaluation reste incomplète car elle ne reflète pas les proportions des différents acides aminés (i.e. protéiques et libres) (Encadré 1). En effet, à l'instar du reste du règne animal, les abeilles sont incapables de synthétiser certains acides aminés qualifiés d'essentiels et doivent donc impérativement les puiser d'une source exogène (Table 2) (De Groot, 1953). Selon la ressource exploitée, le profil en acides aminés varie et bien qu'il semble relativement conservé au sein du pollen de diverses espèces florales (Roulston & Cane, 2000 ; Weiner *et al.*, 2010), quelques pollens étudiés à ce jour présentent une carence en certains acides aminés essentiels, notamment quelques espèces de *Taraxacum* carencées en tryptophane et phénylalanine (Roulston & Cane, 2000). A nouveau, ces analyses nutritionnelles mettent en évidence la disparité du contenu nutritionnel du pollen selon son origine floristique (Génissel *et al.*, 2002 ; Hanley *et al.*, 2008

Table 2. Composition idéale des acides aminés essentiels pour *Apis mellifera* (d'après De Groot, 1953).

Acide aminé	Balance en acides aminés essentiels requis par l'abeille domestique (%)
Arginine	11
Histidine	5
Isoleucine	14
Leucine	16
Lysine	11
Méthionine	5
Phénylalanine	9
Thréonine	11
Tryptophane	4
Valine	14

1.2. Plantes et abeilles : une relation particulière

Les relations entre les plantes à fleurs et les abeilles remontent à l'origine même de l'apparition des abeilles (Danforth *et al.*, 2013). Ainsi, la grande majorité de plantes à fleurs (80%) sont dépendantes de vecteurs animaux pour leur reproduction sexuée. Parmi ces vecteurs, les abeilles constituent le groupe majoritaire de pollinisateurs dans les milieux tempérés (Buchmann & Nabhan, 1996 ; Potts *et al.*, 2010). Par rapport à d'autres pollinisateurs tels que les coléoptères, les abeilles présentent la particularité de dépendre exclusivement des plantes à fleurs à tous leurs stades de développement (i.e. adulte et larve). Grâce à leurs adaptations, les abeilles sont particulièrement efficaces et peuvent même dans certains cas collecter de 70 à 90% du pollen disponible en une seule visite. De telles récoltes excessives peuvent être dommageables pour la plante étant donné que la plupart du pollen récolté est perdu pour la reproduction florale (Müller, 1996 ; Westerkamp, 1996 ; Thomson, 2003 ; Müller *et al.*, 2006 ; Schindwein *et al.*, 2005). Par conséquent, les plantes font face à un dilemme : attirer les abeilles pour assurer leur pollinisation d'une part, limiter l'exploitation excessive de leur pollen d'autre part (Praz *et al.*, 2008 ; Sedivy *et al.*, 2011). De ce fait, les relations plante-abeille ne peuvent être considérées comme un mutualisme classique mais sont plus justement qualifiées d'exploitation mutuelle en équilibre (Westerkamp, 1996). Pour assurer leur reproduction, les plantes pourraient augmenter leur production de pollen afin de compenser la perte liée à l'activité des abeilles mais cela impliquerait des coûts métaboliques supplémentaires. A l'heure actuelle, divers traits morphologiques floraux sont connus pour avoir évolué dans les taxa de plantes pollinisées par les abeilles comme garde-fous afin de protéger la fleur contre les collectes excessives de pollen, notamment des morphologies florales complexes (e.g. symétrie bilatérale chez les Fabaceae et Lamiaceae) ou la déhiscence limitée des anthères (e.g. déhiscence poricide chez les Ericaceae et Solanaceae) (Thorp, 2000 ; Schindwein *et al.*, 2005 ; Praz *et al.*, 2008 ; Sedivy *et al.*, 2011). De plus en plus d'études suggèrent que certaines plantes présentent un pollen de faible qualité nutritionnelle et/ou toxique pour en limiter la consommation par les phytophages (Sedivy *et al.*, 2012). La production de composés secondaires est déjà bien connue dans les parties végétatives des plantes comme défense contre l'herbivorie. Un tel mécanisme pourrait être effectif dans les récompenses florales à des fins dissuasives et protectrices pour limiter la collecte excessive du pollen par les abeilles (Mithöfer & Boland, 2012).

Bien que le rôle principal du nectar soit l'attraction des pollinisateurs (Fægri & van der Pijl, 1979) ; des composés secondaires, généralement toxiques ou répulsifs, y sont retrouvés : alcaloïdes, glycosides, composés phénoliques et acides aminés non-protéiques (Table 3) (Baker, 1977 ; Adler, 2000 ; Lundgren, 2009 ; Gosselin *et al.*, 2013). Retrouvés dans 21 familles de plantes à fleurs, la présence de métabolites secondaires dans le nectar est un phénomène assez répandu (Adler, 2000 ; Lundgren, 2009). Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer la fonction de ces métabolites secondaires : (i) favoriser les spécialistes, (ii) éviter les vols de nectar, (iii) prévenir la dégradation microbienne et (iv) modifier le comportement des pollinisateurs (Adler, 2000). Un lien évident a été établi entre les composés secondaires du nectar et sa toxicité (Adler, 2000 ; de Melo *et al.*, 2013).

Cependant, une concentration suffisante est requise pour avoir des conséquences sur la survie des phytophages (Sedivy *et al.*, 2012 ; Gosselin *et al.*, 2013).

Alors que le nectar de plantes indigènes peut s'avérer toxique pour des espèces de pollinisateurs exotiques (i.e. *Apis mellifera*) (Adler, 2000), certains insectes indigènes spécialistes ne semblent peu ou pas affectés, suggérant des adaptations physiologiques (Müller & Kuhlmann, 2008). En effet, Manson & Thomson (2009) soulignent que la consommation d'un nectar toxique implique un coût énergétique pour les insectes non spécialisés. Dans certains cas, la présence de composés secondaires peut s'avérer bénéfique pour le pollinisateur. Manson *et al.* (2010) ont montré une diminution de la sensibilité aux infections (i.e. l'agent pathogène *Crithidia bombi*) chez les bourdons se nourrissant de nectar toxique, l'insecte bénéficiant ainsi d'un gain physiologique.

A l'instar du nectar, des substances toxiques sont retrouvées dans certains pollens : des mannoses (Crane 1977, 1978), divers alcaloïdes (Detzel & Wink, 1993) et des polyphénols (Carisey & Bause, 1997). Ainsi, plusieurs taxa parmi les Asteraceae sont connus pour présenter des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le pollen (Anke *et al.*, 2004). Boppré *et al.* (2008) ont récemment mis en évidence la présence de tels alcaloïdes dans le pollen d'*Echium vulgare* L. comme l'échinatine. De plus, plusieurs études attestent de la présence de composés pyrrolizidiniques chez les Ranunculaceae (Sedivy *et al.*, 2012 ; Gosselin *et al.*, 2013). Ils ne sont donc pas exclusifs aux Asteraceae et sont retrouvés principalement dans cinq familles d'Angiospermes : Boraginaceae, Apocynaceae, Fabaceae, Ranunculaceae et Asteraceae (Hartmann & Ober, 2000). Smith & Culvenor (1981) estiment à 3% la proportion de plantes à fleurs possédant des alcaloïdes pyrrolizidiniques. Praz *et al.* (2008) suggèrent que l'échec du développement des abeilles spécialistes sur du pollen non hôte est probablement dû à la présence de tels composés secondaires. Par ailleurs, Reinhard *et al.* (2009) montrent que des abeilles mellifères nourries sur du pollen contenant des alcaloïdes pyrrolizidiniques présentent une plus petite taille ainsi qu'une forte mortalité.

Table 3. Composés secondaires rencontrés dans certains pollens (d'après Adler, 2000).

Famille	Espèce	Composé secondaire
Asteraceae	<i>Senecio jacobaea</i> L.	Alcaloïdes pyrrolizidiniques
Boraginaceae	<i>Echium plantagineum</i> L.	Alcaloïdes pyrrolizidiniques
	<i>Tournefortia hirsutissima</i> L.	Composés phénoliques et alcaloïdes
Ericaceae	<i>Arbutus unedo</i> L.	Arbutine (glycoside)
	<i>Rhododendron ponticum</i> L.	Acetylandromedol (alcaloïde)
Fabaceae	<i>Astragalus miser v. serotinus</i> L.	Misérotoxine (glycoside nitropropanolique)
Solanaceae	<i>Atropa belladonna</i> L.	Alcaloïdes

Plusieurs études relatives à la digestibilité et au contenu nutritif du pollen ont été réalisées sur *Bombus terrestris* L. et mettent en évidence un impact direct de la composition chimique du pollen sur le développement de colonies de bourdons (e.g. Tasei & Aupinel, 2008a ; Roelandts, 2010 ; Moerman, 2011 ; Vanderplanck *et al.*, 2014b). En outre, l'impossibilité de plusieurs espèces d'abeilles spécialistes à se développer sur du pollen non-hôte indique clairement que le pollen de certains taxa de plantes (e.g. Asteraceae et

Ranunculaceae) possède des propriétés défavorables ou protectrices rendant la digestion difficile (Praz *et al.*, 2008). Ces résultats concordent avec d'autres études suggérant que le pollen des Asteraceae est difficile à utiliser par les abeilles non spécialistes (Williams, 2003 ; Rasmont *et al.*, 2005 ; Müller & Kuhlmann, 2008). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces observations. Des adaptations physiologiques semblent requises pour une utilisation optimale du pollen des Asteraceae par les abeilles afin de (i) détoxifier les composés toxiques, (ii) faire face au faible contenu protéique, (iii) compenser le manque d'acides aminés essentiels ou (iv) dégrader les grains de pollens (i.e. digestibilité). Williams (2003) a montré que les composés secondaires interfèrent avec le processus d'assimilation des nutriments rendant la digestion difficile. Cependant, certains insectes ont développé des mécanismes afin de détoxifier, d'excréter voire même de séquestrer des composés toxiques issus des plantes (Mithöfer & Boland, 2012). En effet, certains insectes spécialistes ont développé des mécanismes spécifiques pour faire face à des composés potentiellement dangereux. Ces adaptations varient de la tolérance liée à un taux d'excrétion rapide (e.g. Sadasivam & Thayumanavan, 2003) à des mécanismes de séquestration, stockage et intégration dans la défense spécifique des insectes. Cette dernière inclut souvent des adaptations biochimiques et comportementales sophistiquées assurant dans certains cas la protection des œufs contre les parasites (e.g. Hartmann & Ober, 2008). Cresswell *et al.* (2012) montrent que les abeilles domestiques semblent moins affectées par l'ingestion d'un insecticide, l'imidaclopride, que les bourdons. De par son origine équatoriale, *Apis mellifera* serait pré-adaptée aux nectars des plantes tropicales dans lesquels les alcaloïdes naturels sont plus fréquents. De plus, des études ont mis en évidence le rôle clef du cytochrome P450 dans la détoxification des composés phytochimiques présents dans le nectar et le pollen chez *Apis mellifera* (Mao *et al.*, 2011; Johnson *et al.*, 2012).

1.3. Le paradoxe des Asteraceae

La famille des Asteraceae, présente dans la plupart des écosystèmes terrestres, est la seconde famille de plantes à fleurs la plus importante en termes de nombre d'espèces. Comprenant plus de 1600 genres et 23000 espèces, elle représente plus de 10% de la diversité des eudicotylédones (Anderberg *et al.*, 2007). Avec plus de 1210 genres et 17000 espèces, la sous-famille des Asteroïdeae constitue à la fois le clade le plus diversifié et le plus dérivé des Asteraceae (Anderberg *et al.*, 2007 ; Stevens, 2012).

Les inflorescences des Asteraceae produisent de larges quantités de pollen et de nectar sur une vaste période de temps, ce qui devrait en faire des hôtes privilégiés pour la collecte de pollen à la fois pour les abeilles spécialistes et généralistes (Minckley & Roulston, 2006). Or, cette famille de plantes présente la particularité d'attirer principalement des abeilles spécialistes (i.e. ne collectant que du pollen d'Asteraceae) et peu d'abeilles généralistes, qui se limitent généralement à la collecte et consommation du nectar. En effet, le pollen d'Asteraceae ne constitue qu'une infime partie des pelotes récoltées par les bourdons (Kleijn & Raemakers, 2008 ; Goulson *et al.*, 2005). Cette particularité, qualifiée de « paradoxe des Asteraceae », pourrait être liée à des adaptations spécifiques des abeilles spécialisées sur Asteraceae qui leur permettent d'en exploiter le pollen ; adaptations que n'auraient pas les abeilles généralistes (Praz *et al.*, 2008 ; Müller & Kuhlmann, 2008).

Les Asteroïdeae se rencontrent dans presque tous les milieux et, en fonction de l'espèce, fleurissent du début du printemps jusqu'à la fin de l'automne. Par conséquent, la faible exploitation par les abeilles généralistes ne peut pas s'expliquer par l'absence de ces plantes dans leurs habitats, ni même par des difficultés d'en extraire le pollen. Pour la plupart des espèces, à l'exception de quelques espèces spécialistes (e.g. *Megachile pilicrus* ; Müller & Bansac, 2004), la récolte ne nécessite aucun maniement ni trait morphologique particuliers. De récentes études suggèrent que des propriétés défavorables ou protectrices du pollen des Asteroïdeae pourraient expliquer ce paradoxe (Praz *et al.*, 2008 ; Müller & Kuhlmann, 2008).

1.4. Objectifs

L'objectif principal de ce mémoire est de décrire et analyser le développement d'une espèce d'abeille polylectique nourrie sur base d'une diète pure de pollen d'Asteraceae, en comparaison à d'autres diètes polliniques.

Dans un premier temps, nous comparons les profils chimiques des pollens de huit espèces d'Asteraceae, majoritairement exploitées par des abeilles spécialistes, avec le pollen de neuf autres plantes connues pour être butinées en abondance à la fois par des abeilles spécialistes et généralistes dont les bourdons. Cette comparaison a pour objectif de mettre en exergue les éventuelles combinaisons de composés chimiques caractéristiques des Asteraceae auxquels les abeilles doivent faire face.

Dans un second temps, nous mesurons l'impact d'une diète composée exclusivement de pollen d'Asteraceae sur le développement de micro-colonies de bourdons et nous identifions les causes pouvant être à l'origine du paradoxe des Asteraceae (i.e. composés/comбинаisons chimiques ou digestibilité).

1.5. Modèles biologiques

1.5.1. Abeille polylectique

Bombus terrestris (L. 1758) (Fig. 4) a été sélectionné comme modèle d'espèce d'abeille polylectique. Cette espèce sociale se nourrit de ressources variées récoltées sur des centaines d'espèces florales différentes au sein de nombreuses familles (Kleijn & Raemakers, 2008 ; Rasmont *et al.*, 2008 ; Leonhardt & Blüthgen 2012). La valeur nutritive d'une diète en pollen présente un impact plus important sur le développement des bourdons que sur celui des abeilles mellifères. En effet, contrairement aux abeilles mellifères, les ouvrières ne modifient pas la composition de la ressource lorsqu'elles nourrissent le couvain (Pereboom, 2000).

Bombus terrestris est l'un des modèles les plus utilisés dans les tests alimentaires des bourdons (e.g. Regali, 1995 ; Regali & Rasmont, 1995 ; Ribeiro *et al.*, 1996 ; Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008a,b ; Řehoř *et al.*, 2014 ; Vanderplanck *et al.*, 2014b). Il constitue également une des espèces dont les modalités d'élevage sont les mieux maîtrisées (Velthuis & Doorn, 2006).

Il s'agit d'une espèce largement répandue dans la région ouest-paléarctique, du pourtour méditerranéen aux alentours d'Helsinki au nord, jusqu'à Atlaï à l'est (Rasmont *et al.*, 2008). Cette espèce compte 9 sous-espèces dont la sous-espèce *terrestris*, commune dans nos régions. Introduite dans de nombreuses régions du monde comme la Nouvelle-Zélande (Goulson & Hanley, 2004) et le Japon (Nagamitsu *et al.*, 2007) en tant que pollinisateur de cultures en serre, cette espèce se révèle rapidement être envahissante et menace les pollinisateurs indigènes (Kenta *et al.*, 2007 ; Nagamitsu *et al.*, 2007, 2009).



Figure 4. *Bombus terrestris* (L.) butinant sur une lavande (© Entomart).

1.5.2. Espèces florales pour l'étude de la composition chimique du pollen

Huit espèces d'Asteraceae, butinées par des abeilles spécialistes pour le pollen et visitées par des abeilles généralistes pour le nectar, ont été sélectionnées (Fig. 5) : l'aster maritime (*Aster tripolium*), le tournesol (*Helianthus annuus*), la porcelle enracinée (*Hypochaeris radicata*), la picride fausse épervière (*Picris hieracioides*), le séneçon du Cap ou sud africain (*Senecio inaequidens*), le séneçon jacobée (*Senecio jacobaea*), le solidage géant (*Solidago gigantea*) et la tanaïsie (*Tanacetum vulgare*). Très peu d'informations sont disponibles concernant la composition chimique de ces pollens.

***Aster tripolium* L. (1753).** L'aster maritime est une plante halophyte annuelle évoluant généralement dans les marais salés et bords de mer (Lambion *et al.*, 2004). Pollinisée par une abeille spécialiste, *Colletes halophilus*, elle est également visitée par des abeilles généralistes. D'un point de vue chimique, son pollen présente un faible contenu polypeptidique (environ 14 mg/g) (Vanderplanck *et al.*, 2014a).

***Helianthus annuus* L. (1753).** Le tournesol est une plante originaire d'Amérique du Nord (Heiser *et al.*, 1969). Il tient une place importante parmi les cultures oléagineuses. Cette espèce est pollinisée par les abeilles domestiques, les bourdons ainsi que par les abeilles solitaires (Burke *et al.*, 2002) et spécialistes du genre *Diadasia* (i.e. *Diadasia envata* ; Sipes & Tepedino, 2005). Son pollen présente une teneur en protéines brutes déficiente à la fois pour la quantité (25%) et la qualité (Nicolson & Human, 2013).

***Hypochaeris radicata* L.** Présente dans presque toute l'Europe et en Afrique septentrionale, cette plante vivace émet une ou plusieurs tiges dressées de 30 à 70 cm présentant des fleurs jaunes (Coste, 1937). Les feuilles, pennatifides, sont étalées en rosette. Sa période de floraison s'étale de début juin à septembre (Grime *et al.*, 1988). Ses principaux pollinisateurs sont les abeilles (Apidae) et les syrphes (Syrphidae) ainsi que des espèces d'abeilles spécialistes (*Dasypoda hirtipes* et *Panurgus calcaratus*). Les têtes florales produisent des akènes possédant un pappus permettant une dispersion par le vent à longue distance (Soons & Heil, 2002). Native d'Europe, la porcelle enracinée présente une distribution presque cosmopolite. Elle évolue principalement dans les prairies mais aussi dans les pelouses et préfère les sols légèrement acides et pauvres en nutriments (Grime *et al.*, 1988). Son pollen est riche en cholestérol (90%) (Barbier, 1966).

***Picris hieracioides* L. (1753).** La picride fausse épervière est une plante herbacée présentant un cycle annuel ou bisannuel selon les conditions (Sans *et al.*, 1998). Au stade végétatif, cette plante forme une rosette basilaire de feuilles d'aspect hérissé dû à la présence de nombreux poils rigides. Une fois la croissance racinaire terminée, elle développe une tige florale pouvant dépasser le mètre et portant de nombreuses têtes florales. Fleurissant de juin à octobre, cette plante présente un pic de floraison fin juillet. Elle est pollinisée par différents types d'insectes comme les coléoptères (e.g. Oedemeridae), les syrphes (Syrphidae) et les abeilles (e.g. Andrenidae, Apidae, Halictidae et Melittidae).

***Senecio inaequidens* DC. (1837).** Le séneçon du Cap est une plante originaire d'Afrique du Sud. Cette plante herbacée pérenne, à tendance ligneuse, se retrouve dans divers milieux : bords de routes, prairies, régions montagneuses, terrains vagues,... (Dimande, 2007). Importée accidentellement en Europe à la fin 19^{ème} siècle dans les laines de mouton (Ernst, 1998), elle est considérée comme l'une des plantes exotiques envahissantes les plus agressives à l'heure actuelle (Heger & Böhmer, 2005). De 60 à 80 cm de haut, elle produit de nombreux capitules jaunes, chacun produisant un grand nombre d'akènes plumeux favorisant sa dispersion (Ernst, 1998 ; Sans *et al.*, 2004 ; López-García & Maillet, 2005 ; Vanparys *et al.*, 2008). En Belgique, sa période de floraison varie de mai-juin à fin octobre. En plus d'une phénologie longue, cette plante est mellifère. Elle attire une série d'insectes généralistes tels des syrphes, des bourdons et des papillons par lesquels elle est pollinisée (Vanparys *et al.*, 2008). Néanmoins, cette plante est toxique et contient des alcaloïdes comme la sénécionine (Dimande, 2007 ; Jacquemart *et al.*, 2013). Ainsi, Jacquemart *et al.* (2013) ont mis en évidence la présence de 13 alcaloïdes pyrrolizidiniques dans les graines, les feuilles, les tiges et les têtes florales.

***Senecio jacobaea* L. (*Jacobaea vulgaris* Gaertn. (1791)).** Le séneçon jacobée présente essentiellement une distribution ouest eurasiennne. Cette espèce, introduite en Amérique du Nord et du Sud, en Afrique du Sud ainsi qu'en Nouvelle-Zélande (Harper & Wood, 1957 ; Bain, 1991), constitue une plante nuisible dans la plupart de ces pays.

Natif d'Europe, *Senecio jacobaea* est une espèce bisannuelle à pérenne florissant entre juin et octobre (Harper & Wood, 1957; Lambion *et al.*, 2004). Ses pollinisateurs majeurs sont les syrphes (Syrphidae) et les hyménoptères (Apidae essentiellement). Cette plante a été sélectionnée comme un modèle d'étude de l'évolution des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans le

genre *Senecio* (e.g. Hol & Van Veen, 2002; Macel *et al.*, 2002; Pelsner *et al.*, 2002; Schaffner *et al.*, 2003).

***Solidago gigantea* L. (1753).** Le solidage géant, également appelé verge d'or géante, est une plante vivace rhizomateuse de 50 cm à 2,5 m de haut. Ses pousses dressées ne sont pas ramifiées à l'exception des inflorescences. Fleurissant à la fin de l'été et à l'automne, *Solidago gigantea* exhibe de nombreuses têtes florales jaunes. Les graines anémochores sont importantes pour la dissémination à longue distance. Originaire d'Amérique du Nord, cette espèce a été introduite en Europe en tant que plante ornementale il y a environ 250 ans. Cultivée initialement dans les jardins, elle s'avère désormais être une plante envahissante en Europe centrale où elle est devenue dominante dans divers habitats tels que les lisières de forêt, les prairies, les berges de cours d'eau et les zones humides (Jakobs *et al.*, 2004). Son étendue actuelle en Europe inclut l'Europe centrale et de l'Est, la partie sud de la Scandinavie et la partie nord de l'Europe du Sud.

***Tanacetum vulgare* L. (1753).** La tanaisie est une plante vivace native d'Europe et d'Asie. Le plus souvent retrouvée le long des routes et dans les prairies, cette plante est considérée comme une espèce pionnière s'établissant après des perturbations du sol (Kleijn, 2003 ; LeCain & Sheley, 2006). Sa période de floraison s'étale de juillet à octobre. Elle est principalement visitée par des syrphes, des papillons et des abeilles (LeCain & Sheley, 2006). Cette plante contenant des alcaloïdes, flavanoïdes et terpénoïdes est utilisée dans des buts médicaux mais aussi comme répulsif contre les insectes (Xie *et al.*, 2009).



Figure 5. Les différentes espèces d'Asteraceae étudiées. **a.** *Aster tripolium* (Pescalune); **b.** *Helianthus annuus* (Maïeutapedia); **c.** *Hypochaeris radicata* (S. Pollock); **d.** *Picris hieracioides* (L. Francini); **e.** *Senecio inaequidens* (K. Peters); **f.** *Senecio jacobaea* (Urban Butterfly Garden); **g.** *Solidago gigantea* (E. Dronnet); **h.** *Tanacetum vulgare* (D. Fenwick).

Neuf espèces florales, appartenant à 8 familles, ont été sélectionnées afin de comparer le contenu nutritif de leurs pollens avec celui des Asteraceae et d'ainsi déceler le syndrome chimique à l'origine du paradoxe des Asteraceae. Toutes ces plantes sont connues pour être butinées à la fois par des abeilles généralistes et spécialistes pour leur pollen. Des données pour la composition chimique de ces pollens sont disponibles dans la littérature (Vanderplanck, 2013) (Table 4).

Table 4. Différents modèles comparatifs associés à leurs visiteurs.

Famille	Espèce	Abeilles généralistes	Abeilles spécialistes (référence bibliographique associée)
Araliaceae	<i>Hedera helix</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Colletes hederæ</i> (Bischoff <i>et al.</i> , 2005)
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Hoplitis anthocopoides</i> (Eickwort, 1970)
Ericaceae	<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Colletes succintus</i> (Müller & Kuhlmann, 2008)
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Melitta leporina</i> (Michez <i>et al.</i> , 2008a)
Lythraceae	<i>Lythrum salicaria</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Melitta nigricans</i> (Michez <i>et al.</i> , 2008b)
Orobanchaceae	<i>Odontites luteus</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Melitta tricincta</i> (Michez <i>et al.</i> , 2008a)
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Hylaeus signatus</i> (Müller <i>et al.</i> , 2006)
Salicaceae	<i>Salix alba</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Andrena vaga</i> (Bischoff <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Salix caprea</i>	<i>Apis</i> & <i>Bombus</i> sp.	<i>Andrena vaga</i> (Bischoff <i>et al.</i> , 2003)

1.5.3. Diètes polliniques destinées à l'élevage

Quatre diètes de pollen provenant de diverses plantes (*Salix* sp., *Cistus* sp., *Trifolium repens* et Asteraceae de type *Cirsium*) et susceptibles d'influencer différemment les développement des micro-colonies ont été sélectionnées. Sur base de la littérature, la diète de *Cistus* sp. (Cistaceae) est considérée comme une ressource pollinique inadéquate pour *Bombus terrestris* du fait de son faible contenu protéique ainsi que de son impact négatif sur le développement de colonies (i.e. faible efficacité) (Tasei & Aupinel, 2008a). Inversement, les diètes à base de pollen de *Salix caprea* (Salicaceae) ainsi que de celui de nombreux membres de la famille des Fabaceae sont considérées comme des ressources bénéfiques (i.e. Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008a ; Vanderplanck *et al.*, 2014b).

Salix sp. Plantes dioïques de la famille des Salicaceae fleurissant de mars à septembre, les saules (Fig. 6) offrent de larges quantités de pollen sur les chatons des plants mâles. Arbrisseaux ou arbres pouvant atteindre de 5 à 18 mètres de haut, ils sont considérés comme une ressource importante de pollen à l'état naturel pour les abeilles sauvages, notamment le saule marsault, *Salix caprea* L. (1753) (Keller *et al.*, 2004).

Ainsi, d'après Vanderplanck *et al.* (2014b), ce pollen constitue une ressource de bonne qualité, riche en stérols bénéfiques pour les bourdons (e.g. β -sitostérol, δ 5-avénastérol et 24-méthylènecholestérol). Sa teneur polypeptidique est relativement élevée (7% de masse sèche) ainsi que sa proportion en acides aminés totaux (19% de masse sèche).

Cistus sp. Appartenant à la famille des Cistaceae, ces arbustes (Fig. 6) constituent un des genres les plus caractéristiques de la flore méditerranéenne. Le genre *Cistus* compte de 16 à 28 espèces selon la source, distribuées en 3 sous-genres (Guzmán & Vargas, 2005). Certaines espèces produisent une large quantité de nectar et de pollen (Talavera *et al.*, 1993).

Différentes études décrivent le pollen de ciste comme une ressource de mauvaise qualité dans le cadre du développement de micro-colonies de bourdons (Tasei & Aupinel, 2008a ; Roelandts, 2010 ; Moerman, 2011 ; Vanderplanck *et al.*, 2014b). Son taux de protéines brutes par masse sèche est de 14,4% d'après Tasei & Aupinel (2008a) et sa teneur en polypeptides avoisine les 2% (Vanderplanck *et al.*, 2014b). Il présente également des proportions raisonnables de stérols bénéfiques pour les bourdons (Vanderplanck *et al.*, 2014b).

***Trifolium repens* L.** Cette plante herbacée de la famille des Fabaceae mesure de 10 à 40 cm et produit des fleurs blanches rosées disposées en glomérules (Fig. 6). Selon l'étude de Kleijn & Reamakers (2008), *Trifolium pratense* L. et *Trifolium repens* L. sont deux espèces présentes dans le régime alimentaire des bourdons. Par ailleurs, des études soulignent les qualités nutritives de son pollen ainsi que sa bonne digestibilité (Crailsheim *et al.*, 1992 ; Roulston & Cane, 2000).

Selon les travaux de Somme *et al.* (2014) sur des pelotes de *Trifolium pratense*, cette ressource présente une teneur en polypeptides d'environ 4% de masse sèche ainsi qu'une concentration en acides aminés totaux relativement élevée (environ 22% de masse sèche). Il dispose également de hautes proportions en stérols bénéfiques pour les bourdons (i.e. δ^5 -avénastérol et 24-méthylènecholestérol). Comme des plantes phylogénétiquement proches présentent une composition chimique très similaire (Roulston *et al.*, 2000), *Trifolium repens* L. dispose probablement d'un contenu nutritif proche de celui de *T. pratense*.

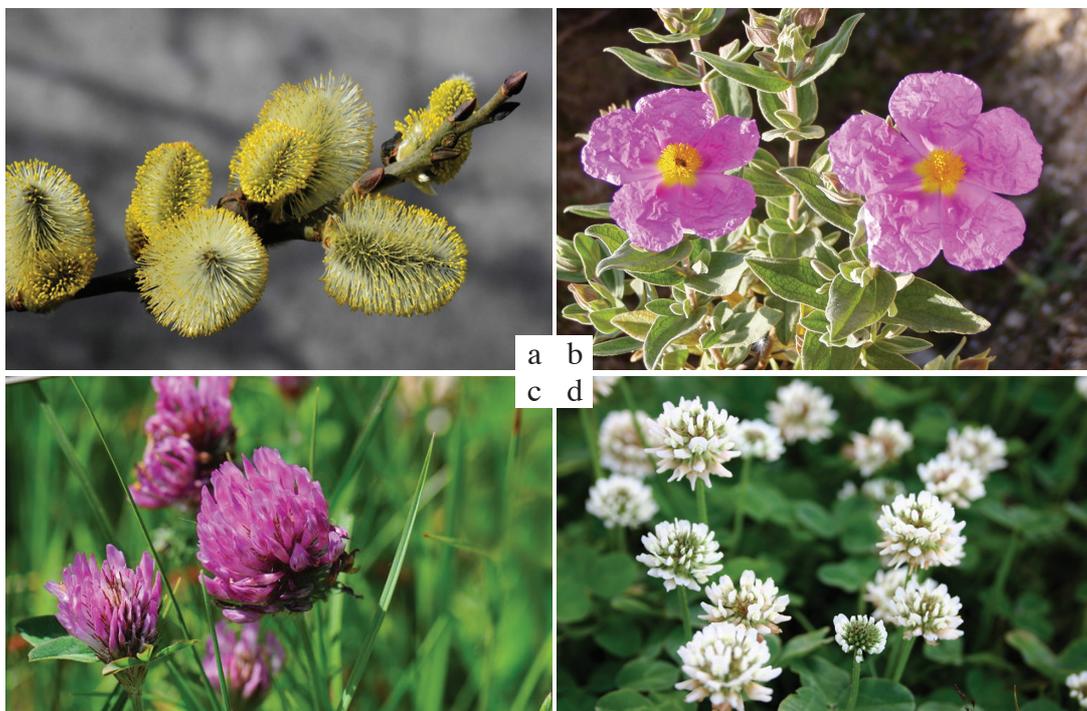


Figure 6. Espèces végétales constituant les diètes utilisées lors des élevages des micro-colonies. **a.** *Salix caprea*, chatons mâles (J.C. Schou) ; **b.** *Cistus albidus* (J. Reis) **c.** *Trifolium pratense* (J.C. Schou) ; **d.** *Trifolium repens* (Casimage).

***Cirsium sensu lato*.** Les espèces présentant ce type de pollen appartiennent à la sous-famille des Carduoideae (Ortiz *et al.*, 2009). Ces plantes herbacées présentent de larges inflorescences, butinées par des Diptères (Syrphidae), des Lépidoptères et des Hyménoptères (Apidae, Halictidae). Parmi les Hyménoptères pollinisateurs se retrouvent notamment des espèces généralistes comme l'abeille domestique mais également des spécialistes comme *Halictus* et *Lasioglossum* spp. (Theis, 2006).

D'après les travaux de Vanderplanck *et al.* (2014a) sur un échantillon de ce type de pollen, cette ressource présente une faible teneur en polypeptides (environ 5% de masse sèche), un contenu protéique de 21,7% de masse sèche et une concentration en acides aminés totaux d'environ 18% de masse sèche. Par ailleurs, l'étude de Somme *et al.* (2014) sur des pelotes de pollen de *Cirsium palustre* montre un faible taux de polypeptides (i.e. environ 1,5% de masse sèche) et une teneur en acides aminés totaux relativement élevée (environ 15% de masse sèche). Cette étude met aussi en évidence que ce pollen est plus riche en δ -stigmastérol (environ 25% du contenu stérolique total) que les autres pollens analysés et n'appartenant pas aux Asteraceae.



Figure 7. Deux genres communs de Carduoideae produisant du pollen de type *Cirsium* et constituant l'une des diètes utilisées lors des élevages. **a.** *Carduus nutans* (N. Sloth) ; **b.** *Cirsium vulgare* (G. Calberac).

2. Matériel et méthodes

2.1. Echantillonnage

La récolte du pollen floral a été effectuée à l'aide d'un diapason ainsi que d'une cupule en verre sur les espèces végétales décrites dans l'introduction (section 1.5.). Le pollen des inflorescences épanouies a été récupéré dans la cupule suite aux vibrations du diapason. Les échantillons de pollen ont ensuite été triés (i.e. impurétés) et stockés à -20°C jusqu'aux analyses chimiques afin d'éviter les dégradations, contaminations et dénaturations.

Les bourdons, issus de colonies de *Bombus terrestris* L., provenaient de la firme Biobest (Westerlo, Belgique). Cette firme dispose d'une longue expertise dans l'élevage de colonies de plusieurs espèces de bourdons pour la pollinisation des cultures.

Les cinq diètes utilisées lors des élevages ont été préparées en utilisant des pelotes d'*Apis mellifera*. En effet, le recours à l'utilisation des abeilles mellifères permet de récupérer de grandes quantités de pollen. Les pelotes de *Trifolium repens* et de *Cirsium* s.l. ont été collectées par l'intermédiaire de ruches munies de trappes à pollen. Elles ont été placées à des endroits et durant les périodes bien déterminés, lorsque la plante cible était abondante. Les diètes de *Salix* sp. et de *Cistus* sp. ont quant à elles été préparées à l'aide de lots commerciaux de pelotes de pollen (*Les Grands Ruchers de France*, Ruchers de Lorraine, Nancy, France).

2.2. Analyses chimiques

Avant de procéder aux analyses chimiques, chaque type de pollen a été placé dans des tubes perforés afin d'être lyophilisé durant 24 h après avoir été congelé durant 45 minutes à -80°C. Après sublimation de l'eau, les tubes ont été couverts de parafilm pour éviter que les échantillons ne s'humidifient, et stockés à -20°C en attendant les analyses. Le pourcentage d'humidité a également été calculé afin d'estimer le teneur en eau des différents pollens.

2.2.1. Les stérols

L'analyse palynologique des stérols est basée sur le protocole établi par Vanderplanck *et al.* (2011), issu du protocole de Lognay *et al.* (1989, 1992). Les extractions ont été réalisées dans le service de Zoologie du Professeur P. Rasmont à l'Université de Mons. Les analyses chromatographiques ont quant à elles été effectuées au sein du laboratoire de Chimie Analytique du Professeur G. Lognay à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Ulg - Gembloux AgroBioTech).

Chaque pollen a été analysé en triplica. Toutes les pesées, que ce soit des pollens (prise d'essai de 15 mg) ou des réactifs, ont été réalisées à l'aide d'une balance analytique à quatre décimales (Kern, ABT 220-4M).

L'extraction stérolique est constituée de quatre étapes importantes : (i) une saponification, (ii) une extraction, (iii) une chromatographie sur couche mince et (iv) une silylation.

La première étape consiste à peser 15 mg de pollen lyophilisé dans un tube à visser grand format (Sovirel) et d'y ajouter 2,5 ml de KOH méthanolique 2M à l'aide d'une pipette graduée. Le tube a ensuite été vortexé afin d'homogénéiser l'échantillon. La saponification a ensuite été effectuée dans un bain marie à 80°C durant 1h. Cette étape vise à séparer la partie

saponifiable de la fraction insaponifiable contenant les stérols sous forme libre. Une fois l'échantillon refroidi à température ambiante, 1 ml de standard interne de bétuline (0,05mg/ml) et 2,5 ml d'eau milli-Q y ont été ajoutés. La bétuline, de concentration connue, permettra d'estimer la concentration des différents composés stéroliques de l'échantillon de pollen.

La seconde étape correspond à l'extraction de la partie insaponifiable. Elle a été réalisée par épuisement à l'aide de trois rinçages successifs avec 5 ml d'éther diéthylique. Afin d'éliminer les savons résiduels de l'échantillon, la phase étherée a été rincée 3 fois avec 5 ml d'eau milli-Q. L'extrait étheré a ensuite été filtré sur du sulfate de sodium anhydre, ce qui a permis d'éliminer toute trace d'eau. Cette filtration a été suivie d'une évaporation sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu ainsi obtenu a été remis en solution avec 250 μ l de chloroforme.

L'étape suivante est une chromatographie sur couche mince. Elle permet de séparer les stérols de la fraction insaponifiable des autres composants (i.e. purification). L'échantillon a été déposé uniformément et de manière linéaire sur la largeur d'une plaque de verre (20 x 20 cm) recouverte d'une fine couche de silice (0,5 mm) et ce, à l'aide d'un capillaire fixé sur un support de chromatographie préparative. Deux spots de standard de chromatographie (mélange de cholestérol et de bétuline) ont été placés de part et d'autre de la ligne de dépôt de l'échantillon. Ces spots de référence définissent les limites de migration des stérols et du standard interne.

Les plaques ont ensuite été placées dans une cuve chromatographique. Celle-ci est remplie à hauteur d'1 cm d'éluant. Il s'agit d'un mélange de chloroforme, éther diéthylique et d'ammoniaque (90:10:0,5). Afin de localiser les composés stéroliques, une solution de 2',7'-dichlorofluorescéine éthanolique 0,2% a été vaporisée sur la plaque sèche une fois la migration terminée. La solution de révélation a permis de repérer les stérols sous ultra-violet à 254 nm. Lorsque la zone contenant les stérols a été délimitée précisément, elle a été grattée à l'aide d'une spatule et la silice récupérée. Trois extractions au chloroforme (5 ml, 3 ml et 3 ml) ont ensuite permis de récupérer par épuisement les stérols purifiés présents sur la couche mince. La phase chloroformée a été filtrée pour éliminer les résidus de silice avant d'être évaporée à sec sous un flux d'azote. L'échantillon est ainsi prêt pour l'étape de dérivatisation.

La silylation constitue la dernière étape du protocole d'analyse stérolique et permet de dérivatiser les échantillons. Elle a été effectuée en ajoutant 50 μ l de Silyl-991 (mélange de BSTFA + 1% TMCS) ainsi que 50 μ l de pyridine anhydre (catalyseur) à l'échantillon. Cette étape s'est déroulée dans un bain-marie à 90°C durant 30 minutes après homogénéisation des réactifs. La silylation consiste en la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement TMS (triméthysilyl). Cette étape permet d'assurer la stabilité des molécules lors de l'analyse en phase gazeuse (GC-FID).

Une fois la silylation réalisée, le mélange a été évaporé à sec sous un flux d'azote. Le résidu a ensuite été remis en solution dans 200 μ l de n-hexane, ce qui constitue l'échantillon final.

Un GC-FID (Gaz Chromatography - Flame Ionization Detector) a permis d'analyser l'échantillon final. Les composés ont alors été identifiés sur base de leur temps de rétention

relatifs et ont été quantifiés via le standard interne. Le modèle utilisé est un GC-800 *Top series* (ThermoQuest) disposant d'un injecteur « On-column » AS-2000 (ThermoFinnigan) ainsi que d'une colonne VF-5ms (30 m ; 0,25mm ID ; $df = 0,25 \mu m$). Le programme de températures utilisé est le suivant : 60°C (1min) jusque 290°C (30°C/min) suivi d'un isotherme à 290°C (27 min) et d'une pointe thermique jusque 325°C (30°C/min) pendant 2 minutes, le gaz vecteur étant l'hélium (90 kPa).

Les chromatogrammes obtenus ont été traités à l'aide du logiciel ChromCard (© Thermo Electron S.p.A.). Seuls les pics compris entre le cholestérol et la bétuline ont été intégrés et leurs aires calculées. Grâce à la concentration connue du standard interne, les concentrations des différents stérols détectés ont été calculées.

2.2.2. Les acides aminés totaux

L'analyse a été effectuée par l'équipe du laboratoire de Chimie Biologique et Industrielle du Professeur B. Wathélet à Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux (Ulg - Gembloux AgroBioTech). Afin d'extraire les acides aminés, chaque pollen a été analysé en triplica sur base du protocole mis au point par Vanderplanck *et al.* (2014a).

L'extraction débute en ajoutant 1 ml de solution d'hydrolyse (6N HCL, 0,1% de phénol et 500 μM de norleucine) à un échantillon de 2 à 3 mg de pollen lyophilisé. La norleucine constitue le standard interne. Cette référence permet d'évaluer la concentration des différents acides aminés de l'échantillon de pollen. Afin de limiter la dégradation de la méthionine, l'échantillon a été placé 1 minute sous azote avant d'être incubé durant 24 heures à 110°C. La fraction résultante a été évaporée sous vide dans un bain-marie à 100°C jusqu'à séchage complet. Le résidu sec a ensuite été remis en solution dans 1 ml de tampon sodium citrate à pH 2,2. Une fois homogénéisée, la solution a été filtrée (porosité de 0,2 μm) et stockée dans une fiole à HPLC avant injection.

Les acides aminés sont séparés par chromatographie échangeuse d'ions (Biochrom 20plus amino acid analyser) puis soumis à une détection photométrique à 570 nm (440 nm pour la proline) après réaction avec la ninhydrine. La quantification est réalisée à partir de la norleucine, les facteurs de réponse pour chacun des acides aminés ayant été préalablement déterminés sur base d'injection de standards de référence.

Cette méthode ne permet cependant pas de quantifier le tryptophane. Néanmoins, il constitue rarement un élément limitant pour les abeilles (Standifer *et al.*, 1980).

2.2.3. Les polypeptides

Les extractions polypeptidiques se basent sur le protocole mis au point par Vanderplanck *et al.* (2014a). Les différentes analyses ont été réalisées au sein du service de Protéomique et Microbiologie du Professeur R. Wattiez, à l'Université de Mons.

Chaque pollen a été analysé en triplica. Pour une extraction polypeptidique, de 4 à 5 mg de pollen lyophilisé sont nécessaires. Toutes les pesées, que ce soit des pollens ou des réactifs, ont été réalisées à l'aide d'une balance analytique à quatre décimales (Kern, ABT 220-4M).

Une fois le pollen pesé dans un eppendorf de 2 ml, un volume de billes de verre équivalent au volume de pollen pesé est ajouté à l'échantillon afin de le broyer et d'obtenir

une fine poudre. Cette opération est effectuée sous azote liquide pour limiter les dégradations. Répétée 5 fois, elle a pour but de faciliter l'extraction des polypeptides et l'élimination des contaminants. Le broyat obtenu a alors subi trois séquences successives de lavage-précipitation afin d'éliminer les contaminants et les pigments du pollen. La première séquence a été effectuée dans une solution de TCA/acétone 10%, la seconde dans solution d'ammonium 0,1 M (méthanol 80%) et la troisième dans une solution d'acétone 80%. A chaque étape, l'échantillon est vortexé pour être mis en suspension, il subit ensuite une centrifugation (13,2 rpm durant 3 minutes) et le surnageant est éliminé. Une fois de plus, afin de limiter les dégradations, ces manipulations ont été réalisées en chambre froide et sur glace.

L'échantillon est ensuite séché sur une plaque chauffante afin d'éliminer toute trace résiduelle d'acétone. 500 µl de tampon d'extraction SDS (30% sucrose, 2% SDS, 0,1M tris-HCl, 5% 2-mercaptoéthanol, pH 8,0) sont ensuite ajoutés en chambre froide au résidu sec. Le mélange est soniqué sur glace (4°C) pendant 10 minutes avant d'être incubé en chambre froide sous agitation constante (thermo-mixeur) durant 10 minutes. Sous une hotte à flux laminaire, 500 µl de phénol ont ensuite été ajoutés au tampon d'extraction et au pollen. Le tout est incubé durant 10 min sous hotte à température ambiante et sous agitation constante (thermo-mixeur). Après une centrifugation de 10 minutes à 13,2 rpm, la phase supérieure phénolique (400 µl) est transférée dans un nouveau tube et complétée avec 1,6 ml d'ammonium acétate 0,1M glacé (méthanol 100%). Après homogénéisation, les tubes ont alors été incubés une nuit entière à -20°C afin de précipiter les polypeptides.

Une fois l'incubation terminée, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 13,2 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot polypeptidique est rincé successivement à l'aide de 1,5 ml de méthanol glacé 100% et de 1,5 ml de méthanol glacé 80% (i.e. cycle vortex/centrifugation/élimination du surnageant). Ces deux lavages successifs ont pour but d'éliminer les résidus phénoliques ainsi que d'éventuels contaminants résiduels. Le culot final est brièvement séché à l'air libre. Une fois sec, il est remis en solution dans 0,5 ou 1 ml de tampon chlorhydrate de guanidine 4M, selon l'importance du culot final, avant d'être vortexé sur glace. Le tout est réalisé en chambre froide.

La quantification des polypeptides est effectuée à l'aide du kit de quantification protéique BCA (Pierce, Thermo Scientific) comme décrit dans le protocole de Vanderplanck *et al.* (2014a). Les polypeptides réduisent l'ion cuivrique (Cu^{++}) en ion cuivreux (Cu^+). L'acide bicinchoninique (ou BCA Protein Assay) est un réactif colorigène, possédant une haute affinité pour l'ion Cu^+ . Une fois associés, un complexe pourpre est formé. Son absorption optique varie entre 540 et 590 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de protéines. Une courbe standard a été créée à l'aide de 9 dilutions d'albumine sérique bovine (BSA) dans le but de déterminer la concentration polypeptidique des échantillons. Afin d'augmenter la précision des mesures, chaque échantillon a été mesuré en triplica. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'absorbance à 570 nm des triplicas a été lue. Trois mesures ont été effectuées : immédiatement à la sortie de l'incubation, 5 et 10 minutes après l'incubation.

2.2.4. Les alcaloïdes

Les analyses d'alcaloïdes se basent sur le protocole de Gosselin *et al.* (2013). La préparation des échantillons (pollens, larves, adultes et déjections) ainsi que les analyses ont été réalisées au sein du service de Chimie Analytique du Docteur G. Glauser (Institute of Biology, Swiss Plant Science Web - Chemical Analytical Service) dans le laboratoire du Professeur T. Turlings à l'Université de Neuchâtel en Suisse. Les échantillons lyophilisés ont été broyés en poudre fine avant les analyses.

A. Préparation des échantillons d'origine pollinique : pollens, contenu des tubes digestifs larvaires et déjections (Fig. 8)

Pour chaque échantillon, 1 mg de matière a été pesé. 100 µl de solution méthanol (MeOH) : eau milliQ (H₂OmQ) : acide formique (FA) (70:30:0,5) ainsi que 4 billes de verre (2mm de diamètre) ont été ajoutés. Le mélange a ensuite été agité à 30 Hz durant 4 minutes avant d'être centrifugé à 14000 rpm durant 4 minutes. L'ensemble du pollen et de la solution d'extraction a été transvasé dans un micro-tube (0,2 µl). Après une centrifugation de 5 minutes à 12000 rpm, 80 µl de surnageant ont été prélevés et transvasés dans une fiole d'injection pour HPLC.

B. Préparation des échantillons d'origine entomologique (Fig. 8)

Tissus larvaires

Après avoir pesé 10 mg de matériel lyophilisé et broyé finement, 300 µl de MeOH 100% et 5 billes de verre ont été ajoutés. Le tout a été agité à 30 Hz durant 4 minutes avant de subir une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm. 200 µl du surnageant ont ensuite été prélevés et transvasés dans un nouvel eppendorf avant d'évaporer l'échantillon au speedvac jusqu'à ce qu'il soit totalement sec. Afin de resuspendre l'échantillon, 200 µl de la solution de H₂OmQ:MeOH:FA (95:5:0,1) sont ajoutés avant de centrifuger le mélange à 14000 rpm durant 5 minutes.

L'échantillon passe alors par une étape de purification sur cartouche SPE (*Solid Phase Extraction*). Tout d'abord, la cartouche subit un conditionnement par 1 ml de MeOH 100% suivi d'un équilibrage avec 1 ml du mélange H₂OmQ:MeOH:FA (95:5:0,1). 150 µl d'échantillon sont ensuite déposés en évitant le culot éventuel. Une première élution avec 1 ml de la solution de H₂OmQ:MeOH:FA (95:5:0,1) permet d'éliminer toute une série de contaminants. Elle est suivie d'une seconde élution avec 1 ml de MeOH 100% permettant de récupérer les alcaloïdes plus ou moins purifiés. L'échantillon purifié est alors séché complètement au speedvac. Le culot est ensuite resuspendu dans 150 µl de MeOH:H₂OmQ:FA (70:30:0,5). Suite à une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm, 100 µl de surnageant sont transvasés dans une fiole d'injection pour HPLC.

Ouvrières

Après avoir pesé 30 mg de matériel lyophilisé et broyé finement, 1 ml de MeOH 100% et 7 billes de verre ont été ajoutés. Le tout a été agité à 30 Hz durant 4 minutes avant de subir une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm. 800 µl du surnageant ont ensuite été prélevés et transvasés dans un nouvel eppendorf avant d'évaporer l'échantillon au speedvac jusqu'à ce qu'il soit totalement sec. Afin de resuspendre l'échantillon, 800 µl de la solution de

H₂O:MeOH:FA (95:5:0,1) sont ajoutés avant de centrifuger le mélange à 14000 rpm durant 5 minutes.

L'échantillon passe alors par une étape de purification sur cartouche SPE (*Solid Phase Extraction*). Tout d'abord, la cartouche subit un conditionnement par 1 ml de MeOH 100% suivi d'un équilibrage avec 1 ml du mélange H₂O:MeOH:FA (95:5:0,1). 750 µl d'échantillon sont ensuite déposés en évitant le culot éventuel. Une première élution avec 1 ml de la solution de H₂O:MeOH:FA (95:5:0,1) permet d'éliminer toute une série de contaminants. Elle est suivie d'une seconde élution avec 1 ml de MeOH 100% permettant de récupérer les alcaloïdes plus ou moins purifiés. L'échantillon purifié est alors séché complètement au speedvac. Le culot est ensuite resuspendu dans 750 µl de MeOH:H₂O:FA (70:30:0,5). Suite à une centrifugation de 5 minutes à 14000 rpm, 100 µl de surnageant sont transvasés dans une fiole d'injection pour HPLC.

C. Analyse chromatographique

Les analyses ont été effectuées par chromatographie liquide à ultra-haute performance couplée à un spectromètre de masse de type quadripôle-temps de vol (UHPLC-QTOFMS). Pour séparer les alcaloïdes, une colonne Waters Acquity BEH C18 (50 x 2,1mm ; 1,7 µm) a été employée à un débit de 400 µl/min. La phase mobile A était de l'eau additionnée d'acide formique (0,05%) et la phase mobile B était de l'acétonitrile additionné d'acide formique (0,05%). Le gradient suivant a été utilisé : 2-45% B en 5 min, 45-100% B en 1 min, 100% B pendant 2 min, retour et rééquilibrage à 2% B pendant 1,5 min. La température de la colonne était de 25°C. Le volume d'injection était de 2 µl.

La détection a été faite en mode d'ionisation électrospray positif. Les paramètres de la source étaient les suivants : voltage du capillaire +2800 V, voltage du cône 40 V, température de désolvation 350°C, débit de gaz de 800 l/heure. Une gamme de masse de 85-1200 Da a été sélectionnée. Afin d'obtenir une mesure de la masse exacte, l'instrument a été calibré de manière externe avec une solution de formiate de sodium avant l'analyse et de manière interne par l'infusion d'une solution de leucine-enképhaline durant l'analyse.

Les chromatogrammes obtenus ont ensuite été traités à l'aide du logiciel MassLynx™ (©Waters). Seuls les pics comprenant un ou deux atomes d'azote ont été pris en compte. Une quantification des alcaloïdes totaux a été réalisée sur base de l'intensité des pics grâce à une droite de calibration (équivalent aconitine).

Pollen, contenu du tube digestif et déjections

1 mg

Bourdon

10 mg larves (30 mg ouvrières)

Lyophiliser et réduire l'échantillon en une poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon

*Ajouter 100 µl MeOH:H₂O:MeQ:FA (70:30:0,5) et 4 billes de verre
Agiter à 30Hz 4min
Centrifuger à 14000rpm 4min
Transvaser dans un microtube
Centrifuger à 12000rpm 5min*

/

Transvaser dans une fiole d'injection à HPLC

Echantillon



Poudre facilitant l'extraction



Extraction des alcaloïdes



Purification sur cartouche SPE



Chromatographie couplée à de la spectrométrie de masse (UHPLC-QTOFMS)

Après lyophilisation, réduction de l'échantillon en une poudre fine à l'aide d'un mortier et d'un pilon

*Ajouter 100 µl (1ml) de MeOH 100% et 5 (7) billes de verre
Agiter à 30Hz 4min
Centrifuger à 14000rpm 5min
Prélever 200µl (800µl)
Evaporer au speedvac
Ajouter 200µl (800µl)
H₂O:MeQ:MeOH:FA (95:5:0,1)
Centrifuger à 14000rpm 5min*

*Conditionnement: 1ml MeOH 100%
Equilibrage: 1ml H₂O:MeQ:MeOH:FA (95:5:0,1)
Dépôt: 150µl (750µl) d'échantillon
Elution 1: 1ml H₂O:MeQ:MeOH:FA (95:5:0,1) (ne pas récupérer)
Elution 2: 1ml MeOH 100% (à récupérer)
Evaporer au speedvac
Reprendre par 150µl (750µl) de MeOH:H₂O:MeQ:FA (70:30:0,5)
Centrifuger à 14000rpm 5min*

Transvaser dans une fiole d'injection à HPLC

Figure 8. Organigramme du protocole d'extraction et d'analyse des alcaloïdes (Declèves S.).

2.3. Elevages

2.3.1. Dispositif expérimental

Les élevages ont été basés sur le protocole de Tasei & Aupinel (2008a). Des micro-colonies de *Bombus terrestris* (i.e. colonies sans reine et avec un faible nombre d'ouvrières) ont été établies en isolant pour chacune d'entre elles 5 ouvrières issues d'une colonie entière. Si une ouvrière vient à mourir avant la ponte, elle est directement remplacée par une ouvrière venant de la colonie originelle.

Isolée de la reine, une des ouvrières devient dominante et pond environ 5 jours plus tard. Dans notre cas, la période avant la ponte a été fixée à 5 jours pour toutes les micro-colonies, le reste étant considéré comme la période après la première ponte. La période d'élevage s'étale sur une durée de 19 jours.

Les ouvrières ont été placées dans des cages en plastique transparent de 16 x 16 x 10 cm (Fig. 9). Le fond grillagé permet aux déjections d'être éliminées de la micro-colonie. Elles sont récupérées sur une plaque de plexiglass de 20 x 20 cm disposée entre le fond de la cage et le réservoir à sirop.

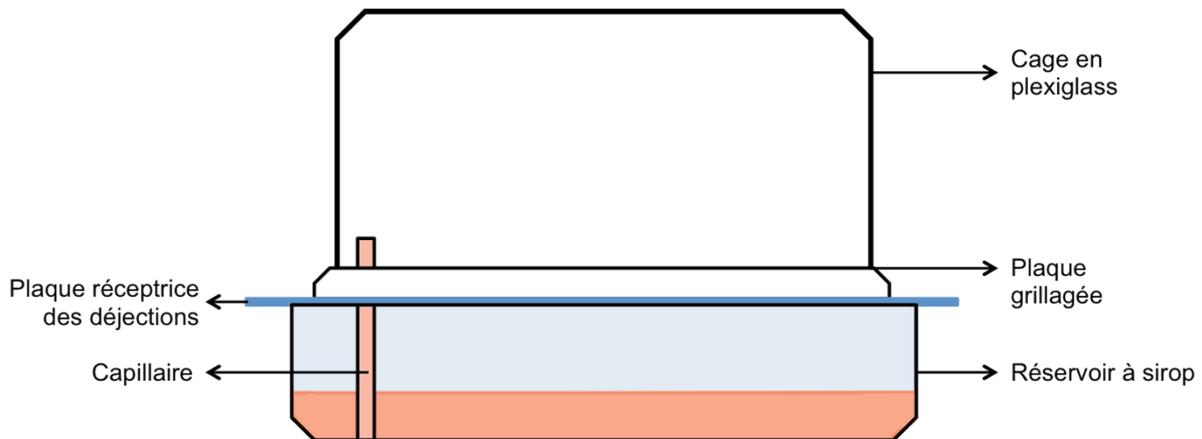


Figure 9. Schéma de micro-colonie de *Bombus terrestris* (Declèves S.).

2.3.2. Conditions d'élevage

L'élevage s'est déroulé dans des conditions standardisées : obscurité, température entre 26-28°C et humidité à 65%. Ces paramètres, primordiaux pour le maintien des colonies de bourdons, sont proches de ceux retrouvés dans un nid naturel de *Bombus terrestris* (Röseler, 1985). La salle a été maintenue dans l'obscurité sauf durant les périodes de travail où la pièce a été plongée en lumière rouge dont le spectre n'est pas visible par les bourdons.

2.3.3. Méthode d'élevage

Un réservoir de sirop (BIOGLUC®) a été placé sous la cage d'élevage. Un tampon de coton permet de l'amener aux ouvrières par capillarité. Le Biogluc® est une solution alimentaire sucrée (sucre inverti) utilisée dans l'élevage industriel de bourdons. Développée par la firme Biobest ; il s'agit d'un mélange d'eau, de sucres, de vitamines, de minéraux contenant un conservateur ainsi qu'un agent colorant facilitant le contrôle du niveau de la préparation.

La quantité totale de sirop collectée a été calculée en effectuant la différence entre le poids initial du réservoir, du tampon de coton ainsi que du biogluc et son poids final. Des mesures ont été également réalisées tous les deux jours afin de mettre en évidence des éventuelles variations de la collecte du sirop au cours du développement des micro-colonies. La masse volumique du sirop a ensuite été déterminée au sein de la salle d'élevage afin d'exprimer la collecte de sirop en millilitres.

Le pollen, tout comme le sirop, a été fourni *ad libitum*. Quatre diètes de pollen (*Salix* sp., *Cistus* sp., *Trifolium repens* et *Cirsium* sensu lato) susceptibles d'influencer différemment le développement des micro-colonies ont été sélectionnées. La composition palynologique des différentes diètes a été vérifiée par microscopie optique. Pour la diète en Asteraceae, au vu de la difficulté de déterminer le pollen sur base de sa morphologie et de notre expertise, des analyses supplémentaires ont été réalisées. Des analyses morphologiques (Département de Biologie, Université de Bergen, Norvège) et le barcoding (Laboratoire Evolution et Diversité Biologique de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France) ont permis de déterminer *Cirsium* sensu lato (s.l.) comme taxon dominant (99%). Malheureusement, ces techniques n'ont pas permis de déterminer plus précisément l'espèce.

Table 5. Séries des micro-colonies associées aux diètes étudiées.

Série	Diète	Nature du pollen	Espèce dominante (%)
I	A	Mix commercial	<i>Salix</i> sp. (85)
II	B	Mix commercial	<i>Cistus</i> sp. (85)
III	C	Pur	<i>Trifolium repens</i> (100)
IV	D	Dilué (α -cellulose)	<i>Trifolium repens</i> (100)
V	E	Pur	<i>Cirsium</i> s. l. (100)

Afin de pouvoir déterminer de manière distincte l'impact de la qualité nutritive et de la toxicité du pollen, une cinquième diète « artificielle » a été établie à base de pollen de *Trifolium repens* supplémenté en α -cellulose (Sigma, EC 232-674-9). Ce composé inodore, inerte et indigeste est couramment utilisé lors de tests alimentaires pour réduire la teneur protéique de pollens divers (Kitoaka & Nieh, 2009). La dilution a été effectuée sur base des données de la teneur en acides aminés totaux des pollens de *Trifolium repens* et *Cirsium* s.l. afin d'obtenir pour la diète « artificielle » une teneur en acides aminés totaux équivalente à la diète d'Asteraceae. Dans ce schéma expérimental, la diète à base de saule constitue le témoin positif, la diète à base de ciste constitue le témoin négatif, la diète à base de trèfle constitue une diète test supposée être bénéfique pour les bourdons, la diète de trèfle diluée (α -cellulose) constitue une diète test de qualité nutritionnelle amoindrie et la diète de *Cirsium* s.l. constitue une diète test de qualité nutritionnelle moindre, potentiellement moins digeste et plus toxique.

Les cinq diètes ont été préparées en utilisant des pelotes d'*Apis mellifera*. Ces pelotes ont été broyées et mélangées à du sirop (Biogluc®). La pâte pollinique résultante a été utilisée pour réaliser des candis qui ont été donnés aux micro-colonies. Les candis ont été stockés à -20°C avant leur utilisation. Par ailleurs, ces candis ont également été soumis à diverses analyses chimiques (citées à la section 3.2.) afin de connaître leur composition chimique en termes de poids frais.

Tous les deux jours, un nouveau candi a été fourni aux différentes micro-colonies. Lors du nourrissage, le nouveau candi est pesé avec précision ainsi que les restes du candi précédent. Cette technique permet de connaître précisément la quantité de pollen collecté. Seul le premier candi est maintenu au sein de la micro-colonie durant toute l'expérimentation car il est souvent utilisé par les ouvrières comme substrat de ponte. Dans le cas où une ouvrière venait à pondre sur un candi fraîchement déposé, ce dernier était également maintenu dans la micro-colonie afin de ne pas biaiser les données relatives au développement des micro-colonies.

Pour chaque diète, une série de 10 micro-colonies a été réalisée. Un total de 50 micro-colonies a donc été mis en élevage (Table 5). Une série de 5 blancs a également été mise en place afin de contrôler l'effet des conditions d'élevage sur le volume de sirop et la masse du candi, permettant ainsi de calculer un facteur de correction d'évaporation du sirop et de modification de masse du candi.

2.3.4. Paramètres considérés

Lors de cette étude, différents paramètres généralement considérés dans les études évaluant la qualité nutritive du pollen (Tasei & Aupinel, 2008 a, b), ont été mesurés et calculés pour chacune des micro-colonies, à savoir : (i) nombre et masse des œufs, (ii) nombre et masse des larves non isolées, (iii) nombre et masse des larves isolées, (iv) nombre total de larves et masse larvaire totale, (v) nombre de larve éjectées, (vi) nombre et masse des pupes, (vii) nombre d'ouvrières mortes, (viii) collecte de pollen après la ponte (i.e. consommation et stockage au sein de la micro-colonie), totale et standardisée (i.e. collecte totale divisée par la masse larvaire totale), (ix) collecte de sirop après la ponte (i.e. consommation et stockage au sein de la micro-colonie), totale et standardisée (i.e. collecte totale divisée par la masse larvaire totale), (x) efficacité pollinique (inverse de viii) et (xi) la digestibilité du pollen pour les ouvrières. Ces différents critères permettront de caractériser pour chacune des diètes la dynamique de développement des micro-colonies, la collecte des ressources par les ouvrières (i.e. pollen et sirop) ainsi que d'estimer l'impact des différentes diètes (i.e. bénéfique ou non). Il est à noter que contrairement aux études traditionnelles déjà publiées, de nouveaux paramètres tels que les collectes de ressources standardisées ont été évalués au cours de cette expérimentation.

Après isolation des ouvrières, les couvains ont été précautionneusement disséqués à l'aide d'un scalpel, de ciseaux et d'une pince. Les œufs, les larves ainsi que les pupes sont comptés et pesés (balance analytique à quatre décimales). Les larves mortes et éjectées n'ont pas été prises en compte lors des pesées mais ont fait l'objet d'un dénombrement tout au long de l'expérimentation. Elles ont été éliminées des cages au fur et à mesure de leur éjection par les ouvrières.

L'indice d'efficacité du pollen a été calculé à partir de la quantité de pollen collecté et de la masse des larves. C'est sur celui-ci que reposent les analyses statistiques de comparaison des pollens. Ainsi, l'efficacité du pollen se présente comme la masse larvaire totale d'une micro-colonie divisée par la quantité totale de pollen collecté par la micro-colonie. Plus l'indice est élevé, plus le pollen peut être considéré comme bénéfique pour l'espèce élevée (i.e. le nombre de larves ou leurs masses individuelles sont importants pour une quantité donnée de pollen).

Enfin, les plaques de plexiglass placées sous le plancher grillagé des micro-colonies ont permis de collecter les déjections des ouvrières. Chaque micro-colonie possède sa propre plaque. Ce dispositif a permis d'établir la digestibilité des différents pollens. Les déjections ont été récupérées au terme de l'élevage en grattant les plaques disposées sous les micro-colonies à l'aide d'une spatule. Les excréments récupérés ont été directement déposés dans des tubes et placés au congélateur afin d'éviter toute dégradation microbienne et ainsi conserver les fèces. Les excréments contaminés par le nectar et/ou par le pollen n'ont pas été récoltés.

L'analyse de la digestibilité se base sur le protocole de l'étude de Fernandes-Da-Silva & Serrão (2000) mais a été adapté à notre expérimentation. Le traitement consiste à monter entre lame et lamelle une faible quantité d'excréments homogénéisée en présence de bleu de méthylène et de gélatine. La préparation est ensuite laissée à sécher avant d'être scellée à l'aide de vernis transparent et observée sous microscope optique. Pour chaque micro-colonie, trois lames ont été réalisées, soit 150 lames au total. Sur chacune de ces lames, les grains digérés et non digérés ont été dénombrés dans différents champs jusqu'à obtenir un total de 200 grains de pollen (DIFF 15, Compact multi-function cell counter). La digestibilité se définit comme étant le rapport du nombre de grains de pollen digérés sur le nombre de grains totaux (i.e. 200). La distinction entre les grains de pollen digérés et non digérés est effectuée sur base de la morphologie et de la couleur des grains : un grain non digéré apparaît comme plus sombre et bien rempli tandis qu'un grain digéré présente une coloration plus claire voire translucide, seul le contour est alors visible (Fig. 10).

2.4. Analyses statistiques

Tous les tests statistiques ainsi que les visualisations graphiques associées ont été réalisés via le logiciel R version 3.0.2. (The R Foundation for Statistical Computing).

2.4.1. Analyses univariées

Des graphiques de type « nuage de points » (scatterplot) ont permis de visualiser les teneurs en stérols totaux, en acides aminés totaux et en polypeptides ($\mu\text{g}/\text{mg}$). Des graphiques de type « boîte de dispersion » (boxplot) ont quant à eux permis de visualiser d'autres paramètres comme l'efficacité (g/g) et la digestibilité (%) des différentes matrices étudiées.

Dans le but de détecter une éventuelle différence significative entre les matrices pour chacun des paramètres susmentionnés, des analyses de la variance à un facteur (One-Way ANOVA) ont été effectuées sur chacun des jeux de données correspondants. Ce test étant paramétrique, la normalité de la distribution des résidus (teste de Shapiro, H_0 = distribution normale) ainsi que l'homoscédasticité des données (test de Bartlett, H_0 = égalité des variances) doivent être vérifiées. Si même après transformation des données ces conditions d'application ne sont pas remplies, elles sont traitées via un test de Kruskal-Wallis, équivalent non-paramétrique de l'ANOVA.

Lorsque le test statistique renvoie une *p-value* inférieure à 0,05 ; un test post-hoc (comparaisons multiples paire par paire) est effectué afin de pouvoir structurer les données et cibler précisément la (les) différence(s) significative(s) détectée(s) entre les différentes matrices. De plus, la structuration des données est également illustrée sur le graphe à l'aide

d'indices lettrés, deux matrices partageant un même indice lettré n'étant pas significativement différentes l'une de l'autre.

2.4.2. Analyses bivariées

Afin d'étudier la dynamique de la collecte de pollen et de sirop durant l'expérimentation, une régression linéaire simple (test paramétrique) a été réalisée pour les collectes de chacune des micro-colonies (i.e. 10 régressions linéaires par diètes) ainsi qu'une régression globale pour chaque diète. Pour chaque modèle linéaire, l'absence d'autocorrélation des résidus (test de Durbin-Watson, H_0 = absence d'autocorrélation), la normalité de la distribution des résidus (test de Shapiro, H_0 = distribution normale) ainsi que l'homoscédasticité des données (test de Breusch-Pagan, H_0 = égalité des variances) ont été vérifiées. La fonction `lm` (package « `lmtest` ») effectuée dans R retourne différents paramètres dont la pente (a) et l'ordonnée à l'origine (b) de l'équation de type $y = ax + b$, ainsi que des tests de significativité qui leur sont associés (i.e. paramètres significativement différents de 0). Une ANOVA est également incluse dans la fonction afin de tester la significativité de la relation précédemment établie. Le R^2 ajusté permet de définir la part de variabilité expliquée par la régression, plus il est proche de 1, plus pour la relation établie est fiable.

Les pentes de régression des micro-colonies ont été comparées entre les diètes pour détecter une différence dans les dynamiques de collecte (ANOVA à un facteur ou Kruskal-Wallis). Les modèles linéaires établis sont illustrés par le biais de nuages de points et de lignes de régression pour chacune des diètes étudiées.

2.4.3. Analyses multivariées

Généralement ces méthodes d'analyses multivariées sont utilisées en biologie afin de traiter des données concernant des communautés écologiques. La similitude entre les tableaux de données chimiques et les tableaux de données de communautés écologiques permet de généraliser ces méthodes aux traitements des compositions chimiques (Vanderplanck *et al.*, 2014b).

Dans le cadre de cette étude, la composition en stérols totaux ainsi que la composition en acides aminés essentiels (mg/g) sont visualisées à l'aide de représentations de type positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS pour non Metric Multidimensional Scaling). Cette méthode, se basant sur les matrices de dissimilarités de Bray-Curtis, permet de visualiser les différences entre les échantillons dans un espace réduit à n dimensions. Le nombre de dimensions est tout d'abord déterminé suite à 10 itérations de la nMDS pour un nombre d'axes allant de 1 à 5 en appliquant la valeur seuil de 0.2 pour la *stress value*. Une fois le nombre de dimensions établi, la nMDS est relancée avec 50 itérations pour retenir la configuration minimisant au mieux la valeur de la *stress value* afin de refléter au mieux la réalité. Chaque matrice est représentée par un symbole unique ou une couleur sur le graphique obtenu. Plus les points sont proches, plus la composition chimique (i.e. stérols ou acides aminés essentiels) les caractérisant est similaire et inversement. Les différentes fonctions utilisées dans R proviennent des packages `ecodist` (Goslee & Urban, 2007), `ellipse` (Murdoch & Chow, 2007) et `BiodiversityR` (Kindt & Coe, 2005).

Une analyse multivariée de la variance par permutation (perMANOVA) est effectuée sur les données visualisées sur la nMDS pour détecter une éventuelle différence significative entre les matrices sur base de leur composition chimique. Il s'agit donc d'une MANOVA réalisée par le biais de permutations, ce qui la rend robuste à la non-normalité des données. Seule l'égalité des matrices de variance/covariance (i.e. homoscedasticité) doit être rencontrée (fonction « betadisper »). La perMANOVA, de la même manière que la nMDS, est réalisée sur une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis et utilise 999 permutations (commande "adonis", R-package vegan, Oksanen *et al.*, 2012). La *p-value* retournée par l'analyse permet d'établir la présence ou non d'une différence significative entre les matrices sur base de leur composition chimique. Lorsque la perMANOVA détecte une différence significative ($p < 0,05$), une comparaison multiple paire par paire (test post-hoc) est réalisée sur les données afin de cibler précisément les différences. Les *p-value* sont ajustées par une correction de Bonferroni pour éviter l'augmentation des erreurs de types I dues aux comparaisons multiples.

Afin de détecter d'éventuels composés indicateurs pour chaque matrice, une analyse en composé indicateur est effectuée (fonction « indval » du package lbdsv ; Roberts, 2012). A partir de la fréquence et de l'abondance relative de chaque composé stérolique et chaque acide aminé, une valeur indicatrice est calculée pour chaque combinaison matrice/composé ainsi qu'une *p-value* afin de déterminer si certains composés sont caractéristiques d'une matrice donnée. Dans le but de limiter le risque d'erreur dû aux tests multiples, la correction de Holm est utilisée pour ajuster les *p-values*.

3. Résultats

3.1. Composition chimique des pollens d'Asteraceae

3.1.1. Composition en polypeptides et en acides aminés

L'ensemble des résultats relatifs aux analyses de polypeptides et d'acides aminés des pollens floraux est présenté dans la table 6. Les tests statistiques associés y sont également compilés.

La concentration polypeptidique totale est significativement différente selon l'origine botanique du pollen ($F = 135,56 ; p < 0,001$) (Table 6). Alors que le pollen d'*Odontites luteus* présente la teneur en polypeptides la plus haute, le pollen de *Tanacetum vulgare* dispose de la plus basse. Les Asteraceae présentent des pollens avec des valeurs polypeptiques hautement variables et ne constituent pas un groupe nettement distinct des autres plantes (Table 6).

A l'instar de la concentration polypeptidique, la teneur en acides aminés totaux du pollen varie significativement en fonction de l'espèce florale ($F = 29,161 ; p < 0,001$) (Table 6). Certaines espèces florales n'appartenant pas à la famille des Asteraceae produisent un pollen présentant une teneur en acides aminés totaux élevée alors que les pollens d'Asteraceae présentent des valeurs plus faibles. Ainsi, les tests de comparaison multiple permettent de mettre en évidence deux groupes : (i) un premier regroupant toutes les espèces qui produisent un pollen à haute teneur en acides aminés totaux (groupe I), et (ii) un second englobant les espèces appartenant à la famille des Asteraceae (groupe II), pour lequel la teneur pollinique en acides aminés est plus faible (Fig. 10).

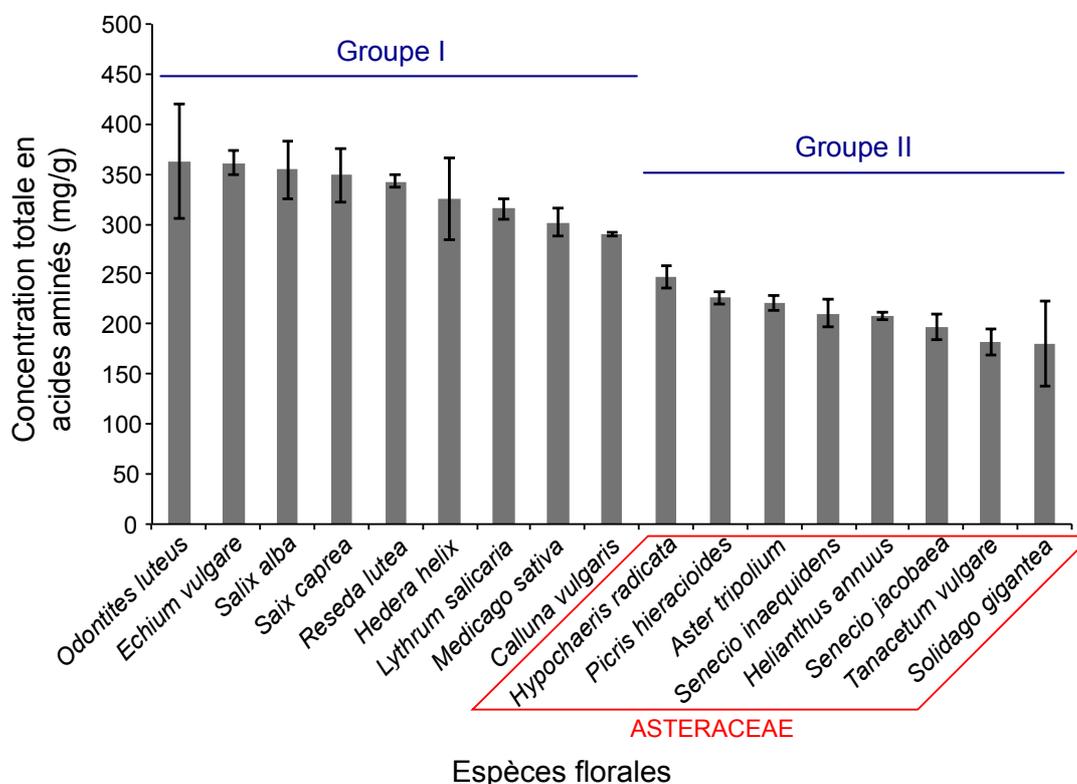


Figure 10. Histogramme de la teneur en acides aminés totaux des différents pollens floraux analysés.

Table 6. Contenu nutritionnel (i.e. teneurs en polypeptides, acides aminés totaux et acides aminés essentiels) des pollens floraux. Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm écart-type. Les valeurs partageant le même indice lettré ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

Familie	Espèce	Polypeptides (mg/g)	Acides aminés (mg/g)	
			Totaux	Essentiels
Araliaceae	<i>Hedera helix</i> (n = 3)	135,56 \pm 13,73 bcd	345,40 \pm 41,16 a	144,38 \pm 19,90 bcde
Asteraceae	<i>Aster tripolium</i> (n = 3)	139,03 \pm 17,68 bc	220,81 \pm 7,46 de	111,24 \pm 3,86 defgh
	<i>Helianthus annuus</i> (n = 3)	125,82 \pm 11,28 bcd	208,15 \pm 3,90 de	117,18 \pm 5,98 cdefg
	<i>Hypochaeris radicata</i> (n = 3)	131,23 \pm 24,87 bcd	246,27 \pm 11,15 bcd	116,90 \pm 5,44 defg
	<i>Picris hieracioides</i> (n = 3)	98,98 \pm 21,04 cd	226,25 \pm 6,24 cde	110,39 \pm 3,02 efgh
	<i>Senecio inaequidens</i> (n = 3)	16,06 \pm 2,97 f	210,89 \pm 13,62 de	106,20 \pm 7,37 efgh
	<i>Senecio jacobaea</i> (n = 3)	16,19 \pm 1,37 f	196,96 \pm 12,52 de	97,81 \pm 5,90 fgh
	<i>Solidago gigantea</i> (n = 3)	17,62 \pm 2,32 f	180,88 \pm 42,90 e	89,97 \pm 21,83 gh
	<i>Tanacetum vulgare</i> (n = 3)	14,36 \pm 2,13 f	181,85 \pm 12,85 e	85,24 \pm 6,04 h
Boraginaceae	<i>Echium vulgare</i> (n = 3)	14,86 \pm 0,81 f	361,18 \pm 11,82 a	175,88 \pm 6,87 abc
Ericaceae	<i>Calluna vulgaris</i> (n = 3)	133,66 \pm 9,33 bcd	290,00 \pm 2,52 abc	145,73 \pm 1,06 bcdef
Fabaceae	<i>Medicago sativa</i> (n = 3)	177,09 \pm 17,93 ab	301,54 \pm 13,52 ab	149,35 \pm 6,51 bcde
Lythraceae	<i>Lythrum salicaria</i> (n = 3)	32,21 \pm 1,35 e	315,23 \pm 10,53 ab	150,78 \pm 4,63 bcde
Orobanchaceae	<i>Odontites luteus</i> (n = 3)	225,90 \pm 14,28 a	363,29 \pm 57,61 a	167,62 \pm 26,15 abcd
Resedaceae	<i>Reseda lutea</i> (n = 3)	84,47 \pm 1,79 d	342,74 \pm 5,84 a	156,41 \pm 4,09 abcde
Salicaceae	<i>Salix alba</i> (n = 3)	189,71 \pm 11,28 ab	354,25 \pm 29,40 a	183,45 \pm 14,95 a
	<i>Salix caprea</i> (n = 7)	140,68 \pm 37,64 bc	348,57 \pm 26,65 a	182,63 \pm 14,45 ab
Test statistique		F = 135,56 <i>p</i> < 0,001	F = 29,161 <i>p</i> < 0,001	F = 16,09 <i>p</i> < 0,001

La teneur en acides aminés essentiels varie significativement selon l'espèce ($F = 16,09$; $p < 0,001$) (Table 6). De nouveau, une grande variabilité existe en fonction des espèces, principalement au sein même de la famille des Asteraceae. Malgré cette variabilité, les comparaisons multiples permettent de former trois groupes : (i) un premier pour lequel le pollen des espèces présente une forte teneur en acides aminés essentiels (groupe I ; *Salix alba*, *S. caprea*, *Echium vulgare*, *Odontites luteus* et *Reseda lutea*), (ii) un groupe intermédiaire (groupe II ; *Lythrum salicaria*, *Medicago sativa*, *Calluna vulgaris* et *Hedera helix*), et (iii) un dernier groupe regroupant toutes les Asteraceae dont la teneur est très variable et globalement plus faible (groupe III) (Fig. 11).

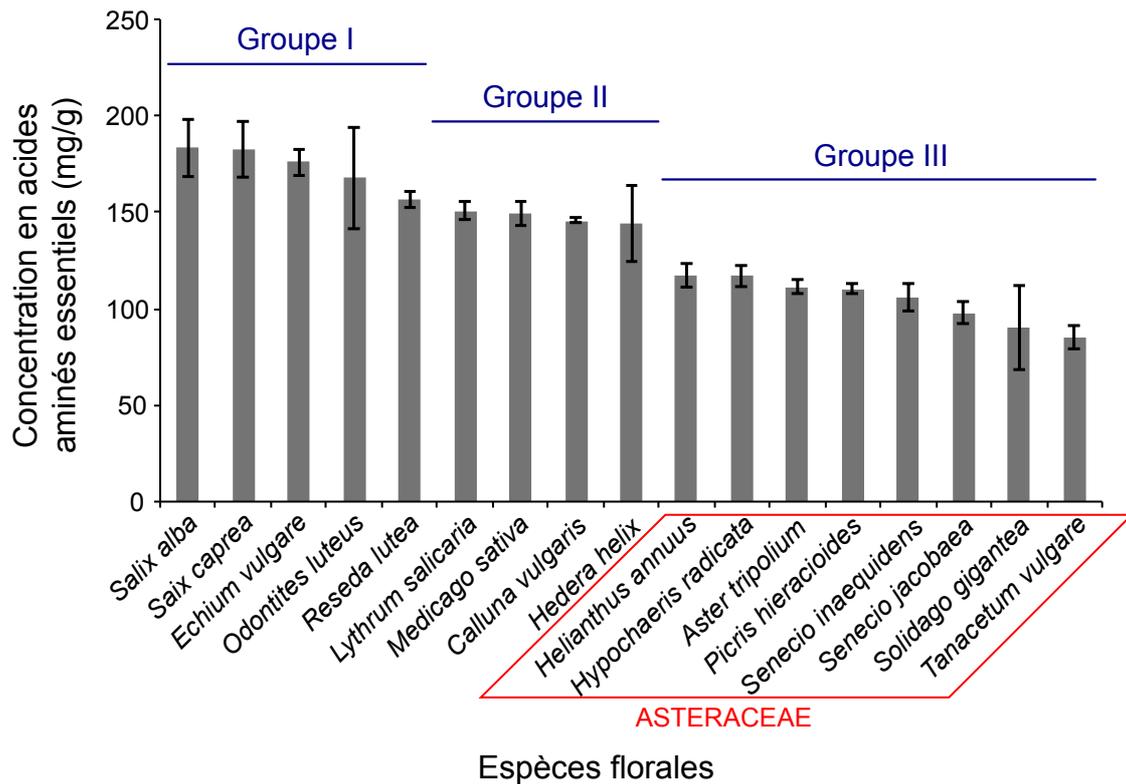


Figure 11. Histogramme de la teneur en acides aminés essentiels des différents pollens floraux analysés.

La teneur en proline varie significativement en fonction de l'origine botanique du pollen ($H = 53,66$; $p < 0,001$). Alors que la teneur des pollens d'*Hedera helix* ($60,04 \pm 7,74$ mg/g) et *Odontites luteus* ($59,69 \pm 11,40$ mg/g) sont les plus élevées, le pollen de *Solidago gigantea* possède la plus faible teneur en proline ($12,47 \pm 3,37$ mg/g). Le pollen des espèces d'Asteraceae étudiées présente une teneur en proline variable selon l'espèce (Annexe 1).

La teneur en aspartate et glutamate des pollens est significativement différente en fonction de l'espèce ($F = 57,76$; $p < 0,001$). Alors que la teneur est la plus haute pour le pollen de *Reseda lutea* ($93,82 \pm 1,90$ mg/g), elle est la plus basse pour le pollen d'*Helianthus annuus* ($31,29 \pm 1,41$ mg/g). Les pollens des espèces d'Asteraceae analysées présentent une plus faible teneur en ces deux acides aminés non essentiels mais riches en azote (valeur moyenne de $40,60 \pm 4,61$ mg/g pour l'ensemble des espèces d'Asteraceae) alors que le pollen des autres espèces en contient en plus grande quantité (valeur moyenne de $74,50 \pm 25,47$ mg/g pour l'ensemble des espèces n'appartenant pas aux Asteraceae).

La perMANOVA détecte une différence significative entre les compositions en acides aminés essentiels du pollen des différentes espèces ($F = 26,65$; $p < 0,001$). Bien que les comparaisons multiples ne permettent pas de structurer clairement les données (Annexe 2), la représentation nMDS à trois dimensions permet de distinguer clairement les pollens des différentes espèces d'Asteraceae du reste des espèces analysées (stress value = 0,03 ; $R^2 = 0,99$) (Fig. 12).

Stress value = 0.03
R = 0.99

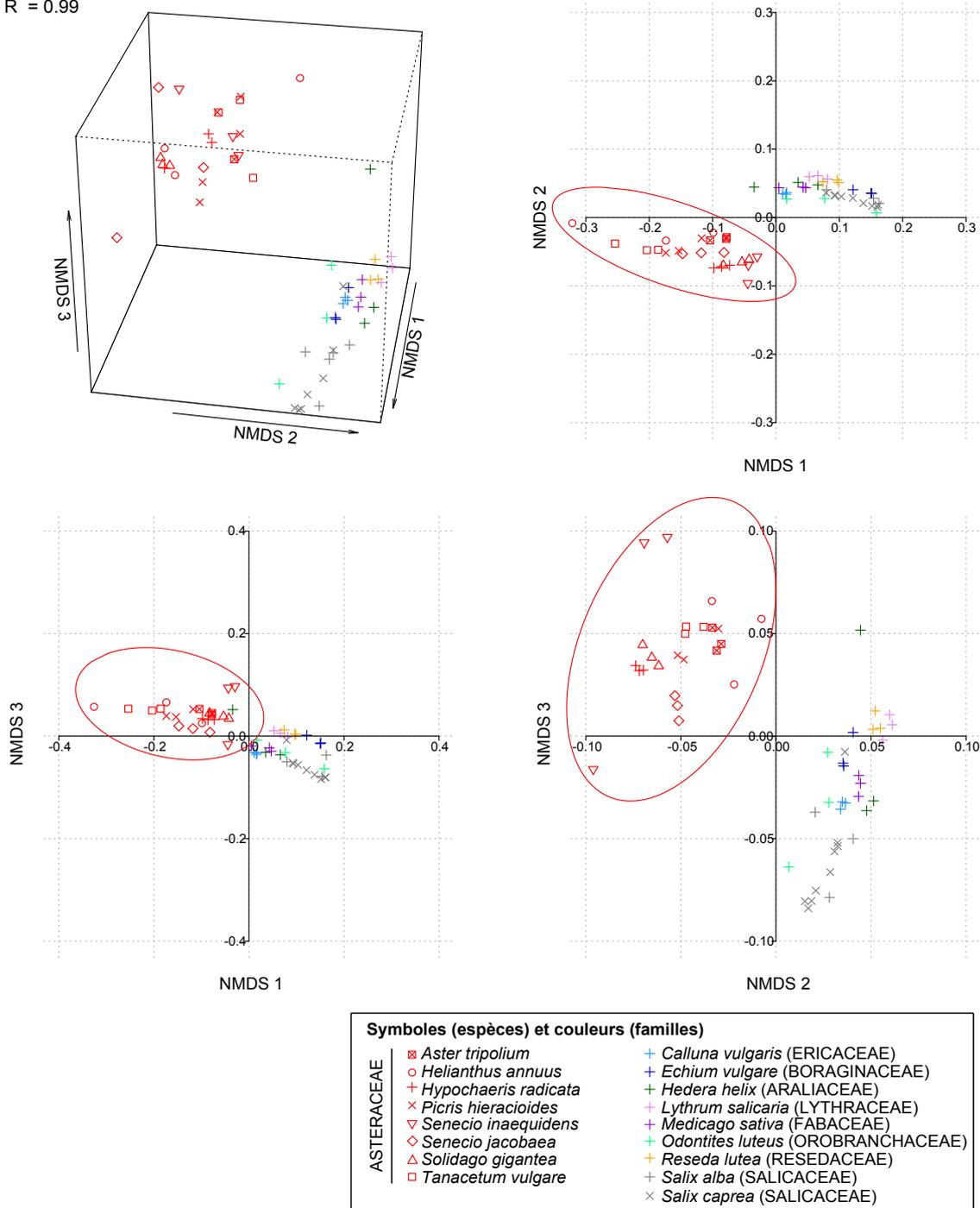


Figure 12. Représentation nMDS (espace des individus) basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur les quantités absolues des acides aminés essentiels (mg/g) dans les différents pollens floraux. Chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité : plus des points sont distants, plus leurs compositions en acides aminés essentiels sont différentes.

L'orientation des vecteurs ainsi que l'analyse en composés indicateurs révèlent que le pollen des espèces d'Asteraceae n'est pas caractérisé par un acide aminé essentiel particulier. Cependant, l'espace des variables permet d'affirmer que le pollen des espèces d'Asteraceae est globalement moins concentré en acides aminés essentiels que le pollen des autres espèces (Fig. 13).

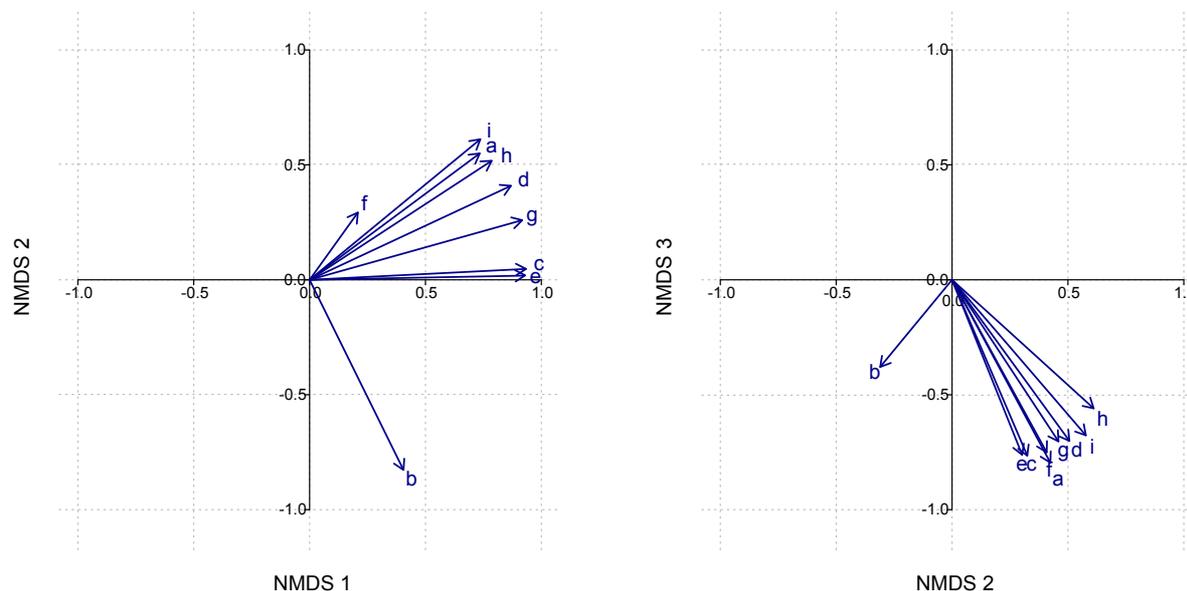


Figure 13. Les trois axes de la représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des acides aminés essentiels (mg/g) dans les pollens floraux des différentes espèces comparées. Dans l'espace des variables, chaque vecteur représente un acide aminé essentiel: a, arginine; b, histidine; c, isoleucine; d, leucine; e, lysine; f, méthionine; g, phénylalanine; h, thréonine et i, valine.

3.1.2. Composition stérolique

Du point de vue stérolique, aucun composé n'est exclusif aux Asteraceae. Néanmoins; le β -sitostérol, le $\delta 7$ -stigmastérol et le $\delta 7$ -avenastérol sont trois composés relativement fréquents et abondants au sein du pollen des espèces d'Asteraceae analysées (Table 7). Le pollen des autres espèces étudiées est généralement plus riche en β -sitostérol et en $\delta 5$ -avenastérol. Cependant, les proportions relatives des différents composés stéroliques varie fortement entre les espèces étudiées (Table 7). Ainsi, le pollen de *Picris hieracioides* présente une forte proportion de cholestérol (près de 70%) alors que le phytostérol majeur du pollen d'*Echium vulgare* est le 24-méthylènecholestérol/campestérol (environ 65%).

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, le test de Kruskal-Wallis détecte une différence significative entre les différents pollens ($H = 48,62$; $p < 0,001$) (Table 7). Alors que les pollens de *Picris hieracioides* et *Lythrum salicaria* présentent les teneurs en stérols totaux les plus élevées, le pollen de *Tanacetum vulgare* dispose de la plus faible teneur en stérols totaux. Les teneurs des autres pollens analysés sont intermédiaires et ne sont pas différentes entre elles. Les Asteraceae ne constituent pas un groupe distinct et présentent des teneurs stéroliques totales variables en fonction des espèces (Table 7).

Table 7. Composés stéroliques des pollens floraux. Les proportions individuelles de chacun des composés sont exprimées en pourcentage de la composition stérolique totale (moyenne \pm écart-type), la concentration en stérols totaux est exprimée en mg par g de pollen lyophilisé (moyenne \pm écart-type). Les trois stérols majoritaires pour chacune des espèces sont en gras. N.D. : non détecté. ^aSous les conditions analytiques appliquées, le campestérol et le 24-méthylènecholestérol sont impossibles à séparer. * Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples sur les concentrations stéroliques totales suite au test de Kruskal-Wallis (H = 48,62 ; $p < 0,001$).

Stérol	Famille	Araliaceae		Asteraceae						
	Espèce	<i>Hedera helix</i> (n = 3)	<i>Aster tripolium</i> (n = 3)	<i>Helianthus annuus</i> (n = 3)	<i>Hypochoeris radicata</i> (n = 3)	<i>Picris hieracioides</i> (n = 3)	<i>Senecio inaequidens</i> (n = 3)	<i>Senecio jacobaea</i> (n = 3)	<i>Solidago gigantea</i> (n = 3)	<i>Tanacetum vulgare</i> (n = 3)
Cholestérol		4,53 \pm 0,66	2,15 \pm 0,63	2,08 \pm 0,31	15,07 \pm 1,77	77,51 \pm 0,69	2,43 \pm 2,74	12,25 \pm 9,81	3,35 \pm 3,50	6,38 \pm 3,54
Desmostérol		0,21 \pm 0,07	0,74 \pm 0,58	N.D.	0,82 \pm 0,20	1,33 \pm 0,60	6,67 \pm 6,23	N.D.	2,68 \pm 0,73	N.D.
24-méthylènecholest./ campestérol ^a		4,96 \pm 0,10	20,23 \pm 0,78	N.D.	6,10 \pm 3,05	0,75 \pm 0,82	2,32 \pm 2,07	11,60 \pm 3,49	6,24 \pm 6,73	9,37 \pm 5,59
Stigmastérol		4,61 \pm 0,03	4,03 \pm 2,59	N.D.	2,72 \pm 1,27	1,10 \pm 0,61	2,61 \pm 2,26	2,28 \pm 2,24	2,57 \pm 1,01	2,24 \pm 2,68
β -sitostérol		25,43 \pm 0,74	2,17 \pm 0,38	10,69 \pm 0,36	19,19 \pm 6,23	3,67 \pm 0,67	23,97 \pm 1,21	16,64 \pm 11,93	17,64 \pm 4,39	20,57 \pm 5,19
δ 5-avenastérol		13,03 \pm 0,13	0,46 \pm 0,21	8,08 \pm 0,24	21,07 \pm 0,22	9,83 \pm 0,37	13,94 \pm 0,22	7,92 \pm 5,47	7,55 \pm 4,05	4,18 \pm 1,13
Cholesténone		1,95 \pm 1,14	1,70 \pm 0,96	0,48 \pm 0,05	1,88 \pm 0,55	0,45 \pm 0,09	0,81 \pm 0,74	2,61 \pm 0,66	N.D.	N.D.
δ 7-stigmastérol		33,06 \pm 0,81	41,23 \pm 2,05	N.D.	33,16 \pm 6,48	5,36 \pm 0,10	16,18 \pm 3,69	37,27 \pm 8,64	48,14 \pm 16,29	48,79 \pm 6,31
δ 7-avenastérol		12,19 \pm 0,45	27,29 \pm 0,59	78,67 \pm 0,90	N.D.	N.D.	31,08 \pm 10,12	9,43 \pm 1,79	11,85 \pm 4,60	8,51 \pm 1,41
TOTAL* (mg/g de matière sèche)		4,11 \pm 0,27 ab	3,21 \pm 0,19 ab	4,04 \pm 0,49 ab	5,14 \pm 1,03 ab	33,25 \pm 7,04 a	3,67 \pm 3,04 ab	3,71 \pm 0,95 ab	5,33 \pm 3,48 ab	2,09 \pm 0,90 b

Table 7. Suite.

Stérol	Famille Espèce	Boraginaceae	Ericaceae	Fabaceae	Lythraceae	Orobanchaceae	Resedaceae	Salicaceae	
		<i>Echium vulgare</i> (n = 3)	<i>Calluna vulgaris</i> (n = 3)	<i>Medicago sativa</i> (n = 3)	<i>Lythrum salicaria</i> (n = 3)	<i>Odontites luteus</i> (n = 3)	<i>Reseda lutea</i> (n = 3)	<i>Salix alba</i> (n = 5)	<i>Salix caprea</i> (n = 9)
Cholestérol		1,52 ± 1,20	2,31 ± 0,53	1,88 ± 1,47	0,59 ± 0,11	1,40 ± 0,22	1,25 ± 0,03	1,47 ± 0,21	1,36 ± 0,29
Desmostérol		0,16 ± 0,24	0,05 ± 0,00	0,11 ± 0,07	0,06 ± 0,02	N.D.	0,12 ± 0,02	5,08 ± 3,29	1,68 ± 1,26
24-méthylènecholest./ campestérol ³		66,53 ± 10,34	2,20 ± 0,09	5,37 ± 5,34	28,49 ± 0,43	9,02 ± 5,26	7,56 ± 0,44	4,26 ± 0,34	4,09 ± 0,56
Stigmastérol		1,89 ± 0,52	12,30 ± 0,96	1,54 ± 1,78	0,87 ± 0,15	4,90 ± 1,15	4,82 ± 0,20	0,54 ± 0,32	1,09 ± 0,56
β-sitostérol		13,15 ± 4,54	42,28 ± 1,46	11,13 ± 5,42	26,28 ± 0,35	43,48 ± 2,65	31,41 ± 1,23	52,40 ± 1,51	41,92 ± 3,90
δ5-avenastérol		7,17 ± 3,24	27,42 ± 0,59	8,13 ± 4,98	24,70 ± 2,56	31,99 ± 1,86	34,59 ± 2,40	33,49 ± 1,46	42,79 ± 2,54
Cholesténone		55,88 ± 0,39	1,89 ± 0,33	2,43 ± 1,28	13,31 ± 1,75	2,11 ± 0,45	6,83 ± 1,59	1,42 ± 0,20	3,36 ± 1,80
δ7-stigmastérol		N.D.	2,48 ± 0,30	58,72 ± 9,01	4,87 ± 0,91	5,23 ± 1,70	10,00 ± 0,18	0,30 ± 0,23	0,95 ± 0,45
δ7-avenastérol		3,70 ± 2,75	9,08 ± 0,44	10,68 ± 5,86	0,84 ± 0,33	1,87 ± 0,41	3,41 ± 0,39	1,04 ± 0,10	2,76 ± 0,48
TOTAL* (mg/g de matière sèche)		3,54 ± 0,27 ab	9,70 ± 0,63 ab	4,43 ± 0,25 ab	16,55 ± 2,34 a	4,48 ± 0,40 ab	8,24 ± 0,81 ab	9,66 ± 1,70 ab	8,66 ± 2,07 ab

Bien que la perMANOVA et les comparaisons multiples détectent la présence de différences significatives entre les compositions stéroliques des pollens des différentes espèces, aucun groupe distinct ne peut-être établi ($F = 27,98$; $p < 0,001$) (Annexe 2). Par ailleurs, la représentation nMDS à trois dimensions ne permet pas de distinguer clairement les pollens d'Asteraceae des autres espèces analysées (Stress value = 0,11 ; $R^2 = 0,94$) (Fig. 14). La perMANOVA confirme que des différences significatives existent entre les compositions stéroliques des différents pollens ($F = 27,98$; $p < 0,001$).

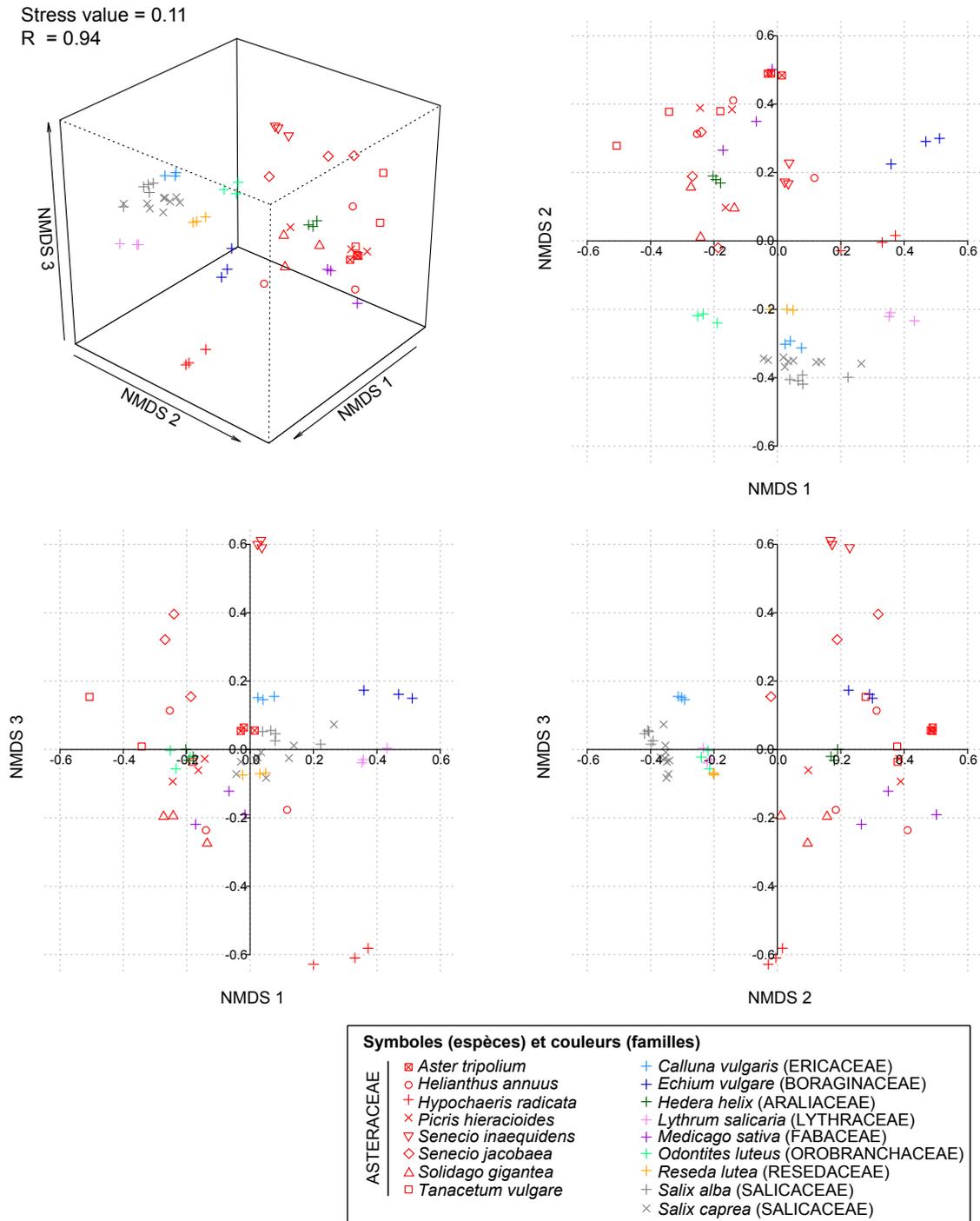


Figure 14. Représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des composés stéroliques (mg/g) dans les différents pollens floraux. Chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité : plus des points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes.

L'analyse en composés indicateurs ainsi que l'orientation des vecteurs dans l'espace des variables (Fig. 15) suggèrent que le pollen des Asteraceae n'est pas caractérisé par un composé stéroïdique particulier. Le profil en stérols varie selon l'espèce et ce, y compris au sein de la famille des Asteraceae.

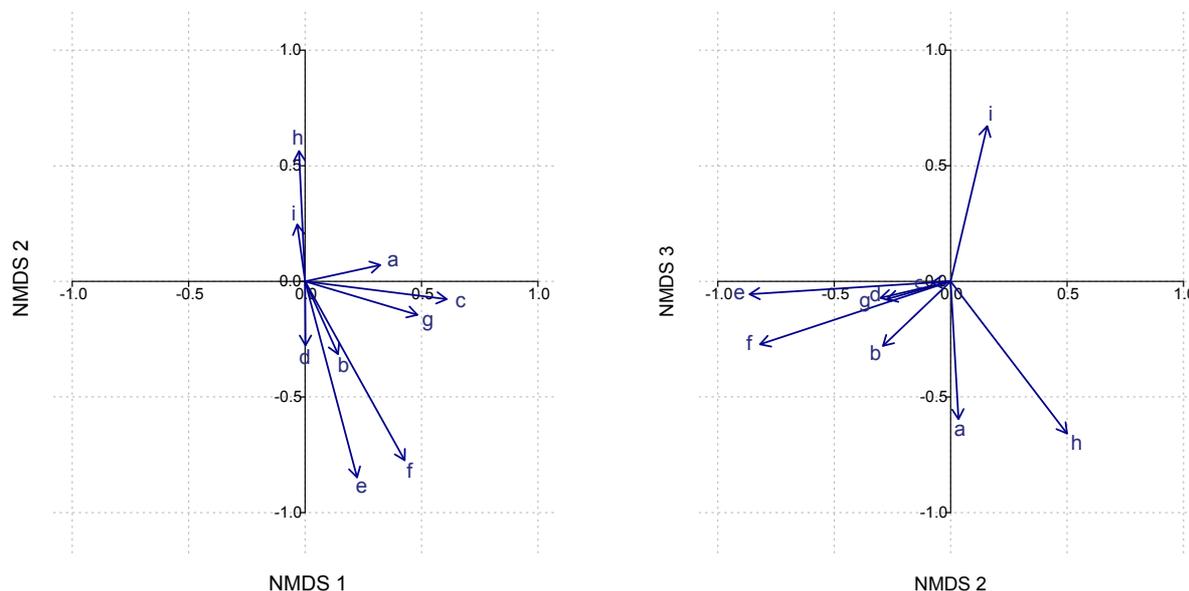


Figure 15. Les trois axes de la représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des composés stéroïdiques (mg/g) dans les pollens floraux des différentes espèces comparées. Dans l'espace des variables, chaque vecteur représente un composé stéroïdique : a, cholestérol ; b, desmostérol ; c, 24-méthylènecholestérol/campestérol ; d, stigmastérol ; e, β -sitostérol ; f, δ^5 -avenastérol ; g, cholesténone ; h, δ^7 -avenastérol et i, δ^7 -stigmastérol.

3.1.3. Alcaloïdes

Les analyses ont détecté la présence d'alcaloïdes uniquement dans le pollen floral de *Senecio inaequidens* (Table 8).

Table 8. Teneurs en alcaloïdes des pollens. Les valeurs sont exprimées en équivalent aconitine, standard utilisé pour la quantification (moyenne \pm écart-type).

Famille	Espèce	Alcaloïdes (mg/g)
Asteraceae	<i>Aster tripolium</i>	0 b
	<i>Helianthus annuus</i>	0 b
	<i>Hypochaeris radicata</i>	0 b
	<i>Picris hieracioides</i>	0 b
	<i>Senecio inaequidens</i>	1,31 \pm 0,24 a
	<i>Senecio jacobaea</i>	0 b
	<i>Solidago gigantea</i>	0 b
	<i>Tanacetum vulgare</i>	0 b
Test statistique		H = 22,88 p = 0,002

Le test de Kruskal-Wallis détecte une différence significative de la concentration en alcaloïdes en fonction de l'espèce florale (H = 22,88 ; p = 0,002) (Table 8). La différence est due au pollen de *Senecio inaequidens* qui est le seul à présenter des alcaloïdes.

3.2. Développement des micro-colonies

3.2.1. Impact sur le bourdon polylectique *Bombus terrestris* L.

3.2.1.1. Collectes en pollen et en nectar

Les résultats des collectes totales de pollen et de sirop ainsi que leurs équivalents standardisés (i.e. collecte divisée par la masse larvaire) sont présentés dans la table 9. Les tests statistiques associés y sont également exposés.

Table 9. Collectes totales de pollen et de sirop par les micro-colonies (n = 10). Les valeurs sont exprimées en minimum – maximum (médiane). Les valeurs partageant le même indice lettré ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre.

Diète	Pollen		Sirop	
	Collecte totale (g) (médiane)	Collecte totale standardisée par la masse larvaire (g/g) (médiane)	Collecte totale (ml) (médiane)	Collecte totale standardisée par la masse larvaire (ml/g) (médiane)
<i>Cirsium</i> s.l.	2,61-9,10 (3,72) b	1,65-47,89 (5,81) a	28,76-38,14 (35,72) abc	6,71-454,48 (61,83) a
<i>Cistus</i> sp.	4,45-11,41 (8,66) a	1,30-2,27 (1,69) ab	25,98-35,81 (32,40) c	4,48-13,42 (7,13) b
<i>Salix</i> sp.	5,38-12,49 (10,06) a	0,97-2,04 (1,47) b	33,40-42,37 (39,39) a	3,60-14,01 (5,72) b
<i>Trifolium repens</i>	2,88-10,95 (6,32) ab	1,00-4,33 (1,50) b	28,95-42,30 (33,16) bc	5,37-20,00 (10,28) b
<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose	3,42-10,46 (8,79) a	1,04-6,29 (1,28) b	33,89-41,05 (37,00) ab	4,18-67,18 (6,87) b
Test statistique	F = 6,23 $p < 0,001$	H = 20,75 $p < 0,001$	F = 6,69 $p < 0,001$	H = 21,66 $p < 0,001$

La composition pollinique des ressources fournies présente un impact significatif sur les quantités de pollen et de sirop collectées. Alors que les pollens de *Salix* sp., *Trifolium repens* dilué avec de l' α -cellulose et de *Cistus* sp. sont les plus collectés ; le pollen de *Cirsium* s.l. est collecté dans une moindre mesure (F = 6,23 ; $p < 0,001$). Par ailleurs, la collecte en sirop des micro-colonies nourries avec la diète *Salix* sp. est significativement supérieure à celles des micro-colonies élevées sur les autres diètes, bien qu'elles diffèrent également entre elles (F = 6,69 ; $p < 0,001$) (Table 9).

La collecte de pollen par gramme de larve est significativement plus élevée pour la diète de *Cirsium* s.l. que pour les autres diètes, hormis le pollen de *Cistus* sp. qui présente un résultat intermédiaire (H = 20,75 ; $p < 0,001$) (Table 9). Ces résultats, indiquent que la quantité de pollen requise pour produire un gramme de larve est significativement plus élevée pour les micro-colonies nourries au *Cirsium* s.l. (Fig. 16).

A l'instar du pollen, le volume de sirop collecté et standardisé par la masse larvaire totale diffère significativement entre les micro-colonies selon la nature pollinique de leur diète ($H = 21,66$; $p < 0,001$). Les micro-colonies élevées sur le pollen de *Cirsium* s.l. collecte significativement plus de sirop que les micro-colonies nourries avec les autres pollens (Table 9). Une plus grande quantité de sirop est donc nécessaire pour produire un gramme de larve (Fig. 17).

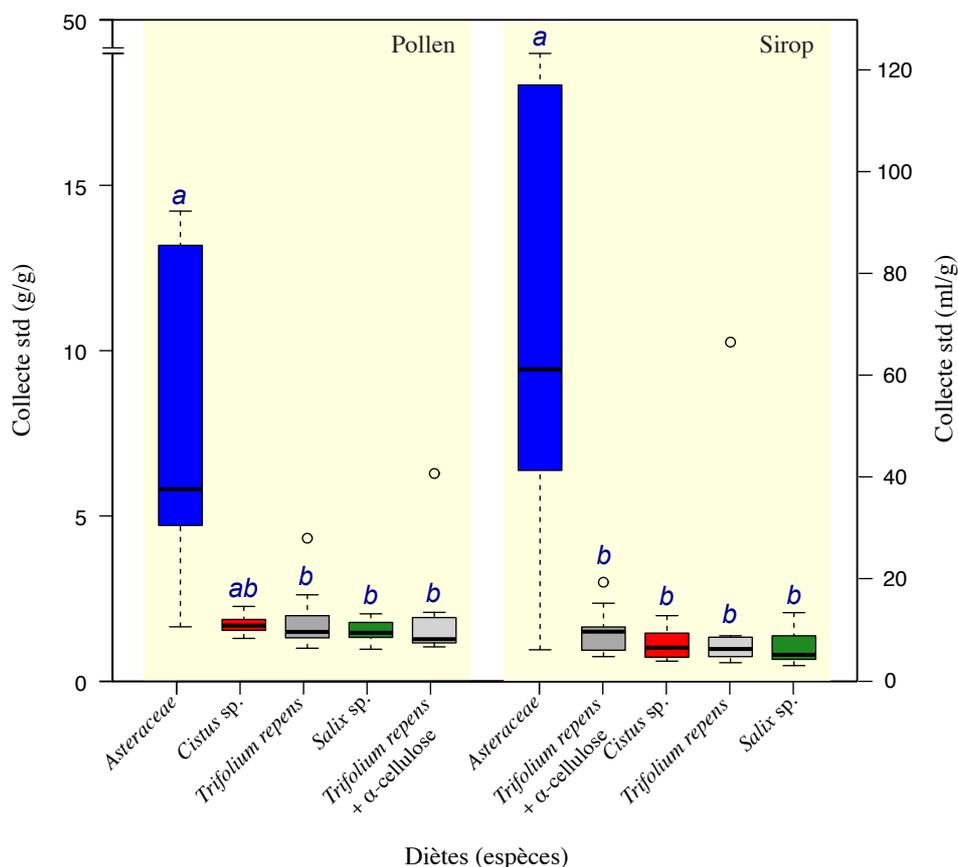


Figure 16. Collectes standardisées de pollen et de sirop des micro-colonies au cours du développement sur différentes diètes ($n = 10$). Les boîtes partageant le même indice lettré ne diffèrent pas significativement entre elles.

Les modèles linéaires établis pour la dynamique de collecte du pollen durant l'élevage diffèrent significativement entre les différentes diètes (comparaison des pentes de régressions ; $H = 25,85$; $p < 0,001$). Ainsi, les micro-colonies nourries à l'aide de *Salix* sp., *Cistus* sp. ou *Trifolium repens* dilué ont significativement plus augmenté leur collecte de pollen au cours de leur développement que les micro-colonies élevées sur le pollen de *Cirsium* s.l. L'augmentation de la collecte de *Trifolium repens* est quant à elle intermédiaire (Fig. 17).

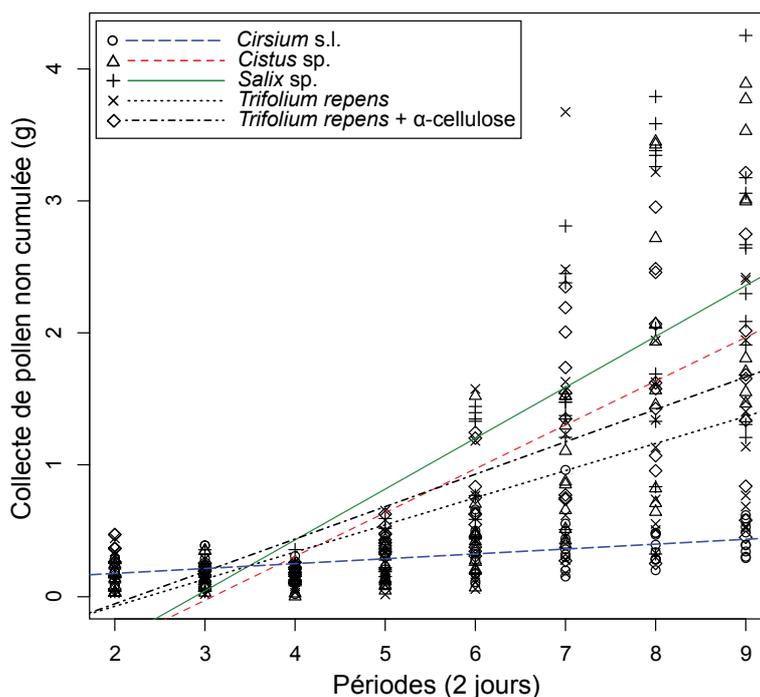


Figure 17. Evolution de la collecte de pollen au cours du développement des micro-colonies sur les différentes diètes (données non cumulées ; $n = 10$). *Cirsium s.l.* : $y = 0,023 x + 0,594$; *Cistus sp.* : $y = 0,106 x + 0,229$; *Salix sp.* : $y = 0,108 x + 0,283$; *Trifolium repens* : $y = 0,074 x + 0,387$; *Trifolium repens* + α -cellulose : $y = 0,075 x + 0,458$.

En ce qui concerne la collecte de sirop, aucune différence significative n'est détectée entre les modèles linéaires établis pour les dynamiques de collecte sur les différentes diètes (comparaison des pentes de régressions ; $F = 1,76$; $p = 0,165$) (Fig. 18).

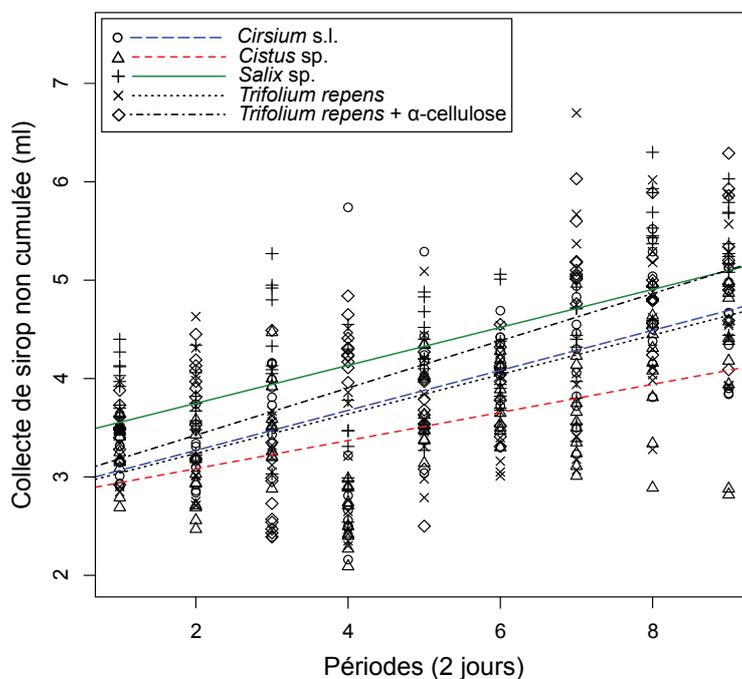


Figure 18. Evolution de la collecte de sirop au cours du développement des micro-colonies sur les différentes diètes (données non cumulées ; $n = 10$). *Cirsium s.l.* : $y = 0,203 x + 2,858$; *Cistus sp.* : $y = 0,143 x + 2,798$; *Salix sp.* : $y = 0,193 x + 3,362$; *Trifolium repens* : $y = 0,200 x + 2,839$; *Trifolium repens* + α -cellulose : $y = 0,240 x + 2,945$.

3.2.1.2. Dynamique de développement

Les résultats complets des paramètres caractérisant le développement des micro-colonies et les tests statistiques associés sont compilés dans la table 10, et illustrés dans la figure 20.

En ce qui concerne le nombre d'œufs, il existe des différences significatives selon la diète ($F = 4,66$; $p = 0,003$). Les comparaisons multiples indiquent que les micro-colonies élevées sur le *Cistus* sp. produisent un nombre d'œufs significativement inférieur à celui produit par les micro-colonies élevées sur les autres pollens (Table 10, Fig . 20). La masse totale des œufs diffère également de manière significative entre les micro-colonies en fonction du pollen fourni durant leur développement ($F = 6,62$; $p < 0,001$).

Alors que le nombre de larves non isolées n'est pas significativement différent selon la diète ($H = 7,04$; $p = 0,13$), elles diffèrent en termes de masse. Les analyses statistiques ont ainsi révélé que les larves des micro-colonies élevées sur du pollen de *Cirsium* s.l. sont significativement moins grosses que celles élevées sur les autres diètes ($H = 16,05$; $p = 0,003$) (Table 10).

Contrairement aux larves non isolées, le nombre de larves isolées est significativement différent selon le pollen utilisé pour l'élevage ($F = 4,59$; $p = 0,003$). Les micro-colonies nourries avec le pollen de *Cirsium* s.l. présentent moins de larves isolées que les micro-colonies élevées sur les autres diètes (Table 10, Fig. 19). De manière similaire, la masse des larves isolées est significativement différente selon la diète pollinique fournie durant l'élevage ($F = 6,09$; $p < 0,001$). A nouveau, les micro-colonies élevées sur le pollen de *Cirsium* s.l. produisent des larves de masse plus faible.

Si aucune distinction n'est établie entre les larves individualisées et non individualisées ; les différences restent détectées entre les diètes lors des analyses statistiques, que ce soit en termes de nombre de larves produites ($H = 14,70$; $p = 0,005$) ou de masse larvaire ($F = 10,24$; $p < 0,001$) qui sont tous deux plus élevés pour les micro-colonies nourries au saule et plus faibles pour les colonies nourries au *Cirsium* s.l.

En ce qui concerne les pupes, aucune différence significative n'a été détectée tant pour leur nombre ($H = 8,25$; $p = 0,08$) que pour leur masse ($H = 8,87$; $p = 0,06$) (Table 10).

Enfin, le nombre de larves éjectées est significativement différent selon le pollen utilisé durant le développement des micro-colonies ($F = 3,68$; $p = 0,01$). Alors que ce nombre est significativement plus élevé pour les micro-colonies nourries au *Cirsium* s.l. que pour celles nourries au trèfle supplémenté en α -cellulose, les autres diètes donnent lieu à des taux d'éjection larvaire intermédiaires.

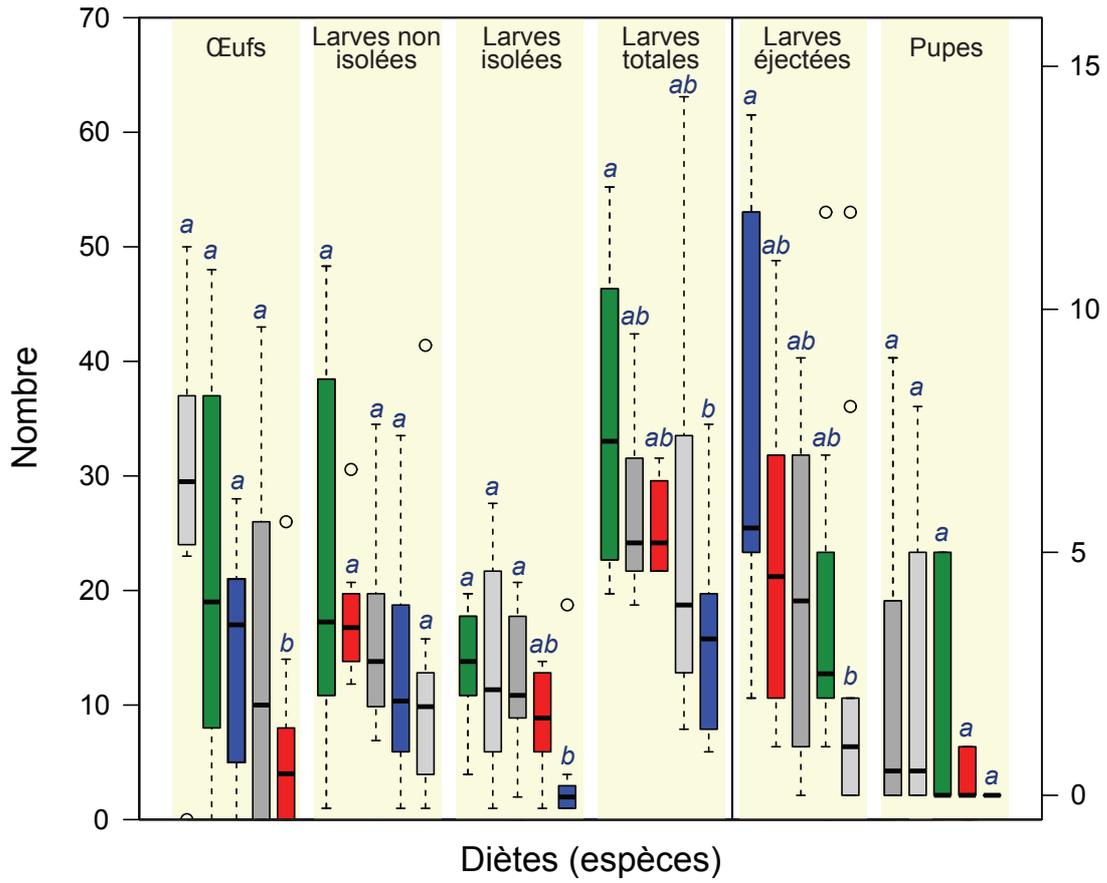


Figure 19. Paramètres mesurés lors du développement de micro-colonies sur différentes diètes polliniques (n = 10). Vert : *Salix* sp. ; Rouge : *Cistus* sp. ; Bleu : *Cirsium* s.l. ; Gris foncé : *Trifolium repens* ; Gris clair : *Trifolium repens* avec α -cellulose. Les boîtes partageant le même indice lettré ne diffèrent pas significativement entre elles.

Table 10. Paramètres de développement de micro-colonies sur différentes diètes polliniques (période de 19 jours, n = 10 micro-colonies). Les données sont exprimées sous forme minimum – maximum (médiane). Les valeurs partageant le même indice lettré ne sont pas significativement différentes.

Diète	Œufs		Larves non isolées		Larves isolées		Larves totales		Pupes		Larves éj.
	Nombre	Masse (g)	Nombre	Masse (g)	Nombre	Masse (g)	Nombre	Masse (g)	Nombre	Masse (g)	Nombre
<i>Cirsium s.l.</i>	0-28 (17) a	0-48,2 (28,2) b	0-33 (10) a	0-0,95 (0,27) b	0-18 (1) b	0-5,52 (0,14) b	5-34 (15) b	0,07-5,52 (0,55) b	0-0 (0) a	0-0 (0) a	2-14 (6) a
<i>Cistus sp.</i>	0-26 (4) b	0-46,3 (5,3) b	11-30 (16) a	0,74-2,94 (1,01) a	0-13 (8) ab	0-6,20 (3,85) a	21-31 (24) ab	2,48-7,10 (4,70) a	0-1 (0) a	0-0,42 (0) a	1-11 (5) ab
<i>Salix sp.</i>	0-48 (19) a	0-75,0 (39,1) ab	0-48 (17) a	0-2,29 (1,36) a	3-19 (13) a	1,56-8,22 (5,86) a	19-55 (33) a	2,85-10,51 (6,94) a	0-5 (0) a	0-2,12 (0) a	1-12 (3) ab
<i>Trifolium repens</i>	0-43 (10) a	0-83,0 (20,9) b	6-34 (13) a	0,14-1,40 (0,60) ab	1-20 (10) a	0,05-7,56 (3,17) a	18-42 (24) ab	1,45-7,48 (3,15) a	0-9 (1) a	0-4,01 (0,28) a	0-9 (4) ab
<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose	0-50 (30) a	0-99,5 (66,7) a	0-41 (9) a	0-4,66 (0,79) ab	0-27 (11) a	0-7,62 (4,44) a	7-63 (18) ab	0,54-8,45 (5,62) a	0-8 (1) a	0-3,44 (0,24) a	0-12 (1) b
Test statistique	F = 4,66 $p = 0,003$	F = 6,62 $p < 0,001$	H = 7,04 $p = 0,13$	H = 16,05 $p = 0,003$	F = 4,59 $p = 0,003$	F = 6,09 $p < 0,001$	H = 14,70 $p = 0,005$	F = 10,24 $p < 0,001$	H = 8,25 $p = 0,08$	H = 8,87 $p = 0,06$	F = 3,68 $p = 0,01$

3.2.1.3. Digestibilité

La digestibilité de la diète est significativement différente selon le pollen de l'espèce florale dont elle majoritairement composée ($H = 44,16$; $p < 0,001$) (Fig. 20). Les comparaisons multiples indiquent que la diète de *Salix* sp. est la mieux digérée suivie de près par les diètes à base de *Trifolium repens*. Le pollen de *Cirsium* s.l. possède la moins bonne digestibilité (Table 11, Fig. 20).

Table 11. Digestibilité des pollens. Les valeurs mentionnées correspondent au pourcentage de grains de pollen digérés. Les valeurs partageant le même indice lettré ne sont pas significativement différentes. $n = 30$ lames (200 grains par lames) pour chaque diète.

Diète	Digestibilité
<i>Cirsium</i> s.l.	18,78 ± 2,81 c
<i>Cistus</i> sp.	60,48 ± 5,75 bc
<i>Salix</i> sp.	95,18 ± 1,41 a
<i>Trifolium repens</i>	88 ± 3,02 ab
<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose	88,1 ± 3,84 ab
Test statistique	$H = 44,16$ $p < 0,001$

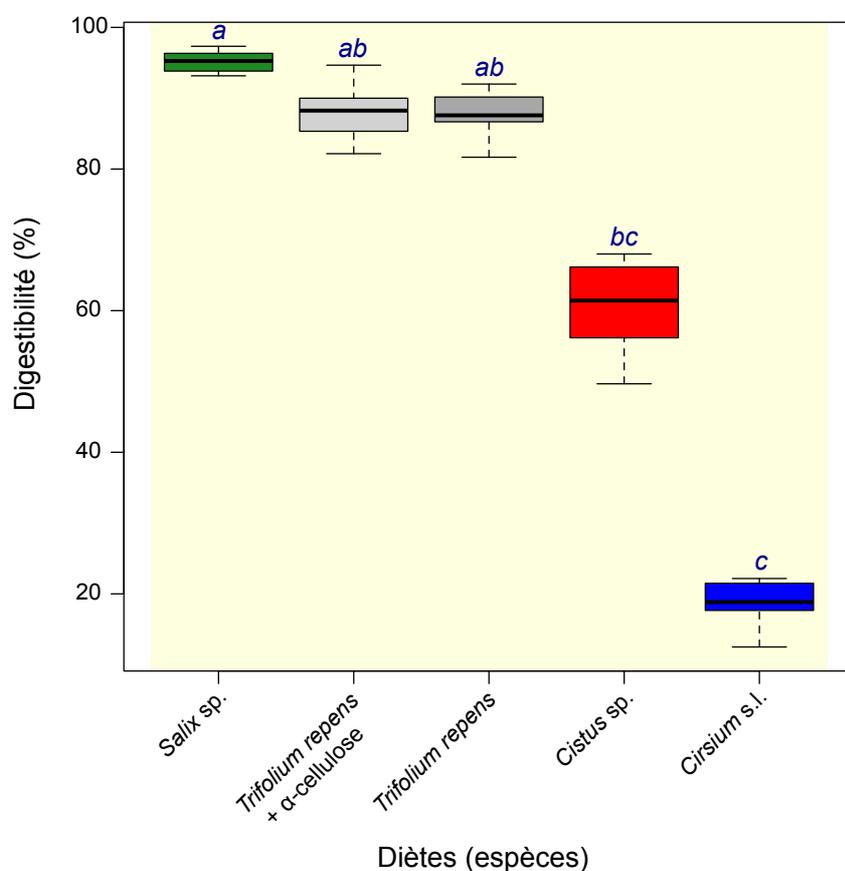


Figure 20. Digestibilité des ouvrières en fonction des diètes étudiées ($n = 30$ lames, 200 grains par lame). Les boîtes partageant le même indice lettré ne diffèrent pas significativement entre elles.

3.2.1.4. Efficacité des diètes

La quantité de pollen collectée après la ponte varie significativement selon la diète utilisée pour l'élevage ($H = 19,56$; $p < 0,001$). Les comparaisons multiples ont permis de déterminer que les micro-colonies nourries avec les pollens de *Cistus* sp., *Salix* sp. et *Trifolium repens* + α -cellulose collectent significativement plus de pollen que celles élevées sur le *Cirsium* s.l. Les micro-colonies nourries avec des candies de *Trifolium repens* collectent des quantités de pollen intermédiaires (Table 12).

Table 12. Efficacité des pollens utilisés pour l'élevage des micro-colonies ($n = 10$). Les données sont exprimées sous forme minimum – maximum (médiane). Les valeurs partageant le même indice lettré ne sont pas significativement différentes.

Diète	Collecte de pollen après la ponte (g)	Efficacité du pollen (g/g)
<i>Cirsium</i> s.l. ($n = 10$)	0,92-7,21 (2,08) b	0,04-0,76 (0,30) b
<i>Cistus</i> sp. ($n = 10$)	2,70-9,67 (7,08) a	0,53-1,01 (0,74) a
<i>Salix</i> sp. ($n = 10$)	3,65-10,84 (8,41) a	0,57-1,23 (0,83) a
<i>Trifolium repens</i> ($n = 10$)	1,35-9,32 (4,59) ab	0,27-1,39 (0,95) a
<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose ($n = 10$)	1,55-8,70 (6,87) a	0,35-1,29 (1,02) a
Test statistique	$H = 19,56$ $p < 0,001$	$F = 9,42$ $p < 0,001$

L'efficacité de la diète est significativement différente selon l'origine botanique du pollen ($F = 9,42$; $p < 0,001$) (Fig. 21). Le pollen de *Cirsium* s.l. est significativement moins efficace que tous les autres. Aucune différence significative n'est détectée entre les autres diètes (Table 12).

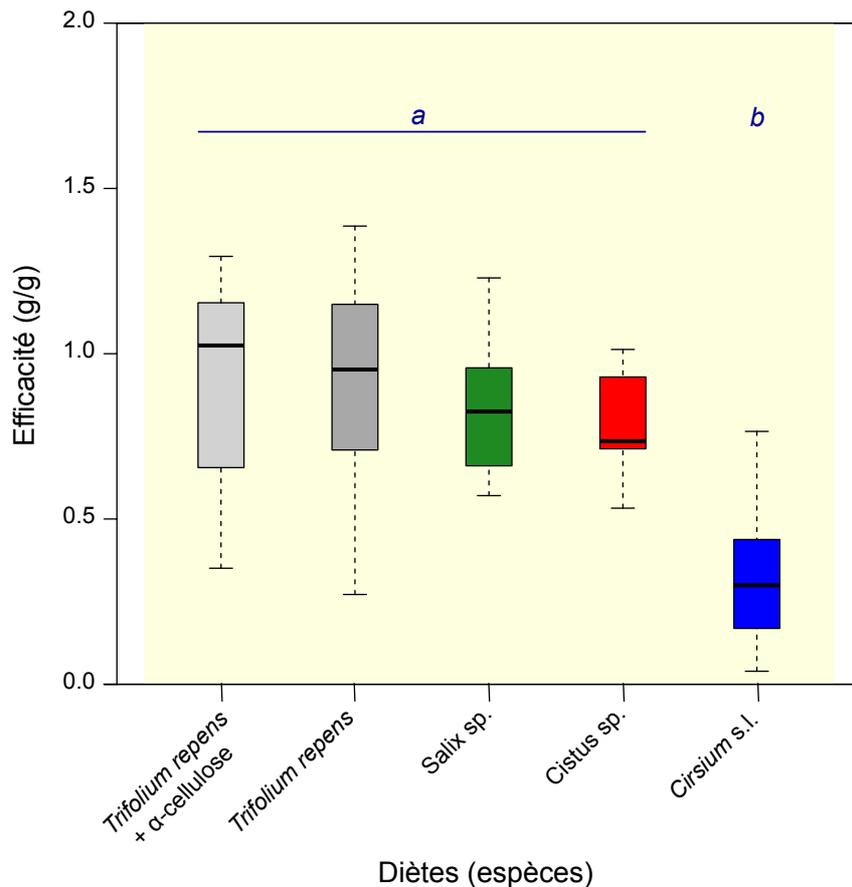


Figure 21. Efficacité des diètes en fonction du type de pollen (n = 10). Les boîtes partageant le même indice lettré ne diffèrent pas significativement entre elles.

3.2.2. Composition chimique des diètes

3.2.2.1. Composition en polypeptides et en acides aminés

La concentration en polypeptides ainsi qu'en acides aminés totaux ne diffèrent pas entre les différentes diètes polliniques ($F = 1,69$; $p = 0,2284$ et $F = 3,29$; $p = 0,06$; respectivement) (Table 13).

A l'inverse, l'analyse de la variance détecte une différence significative de la teneur en acides aminés essentiels selon la diète pollinique ($F = 5,19$; $p = 0,016$). Les comparaisons multiples permettent de distinguer trois groupes : (i) un groupe qui comprend la diète à base de *Cirsium s.l.* dont le contenu en acides aminés essentiels est plus faible, (ii) un groupe comprenant la diète de *Salix sp.* dont le contenu en acides aminés essentiels est plus élevé et, (iii) un groupe qui reprend des diètes de *Trifolium repens* (i.e. dilué et pur) et de *Cistus sp.* qui présentent des contenus intermédiaires ne différant pas significativement des groupes précédents (Table 13, Fig. 22). Malgré ces différences, la proportion en acides aminés essentiels reste hautement conservée dans les différents profils, approximant 50% des acides aminés totaux. De manière générale, les proportions relatives des différents acides aminés sont variables selon la diète (Annexe 3).

Table 13. Contenu en polypeptides et acides aminés des diètes utilisées pour l'élevage des micro-colonies. Les valeurs partageant le même indice lettré ne sont pas significativement différentes.

Famille	Espèce	Polypeptides (mg/g)	Acides aminés (mg/g)	
			Totaux	Essentiels
Asteraceae (n = 3)	<i>Cirsium</i> s.l.	29,25 ± 6,53 a	106,44 ± 1,15 a	45,04 ± 0,63 b
Cistaceae (n = 3)	<i>Cistus</i> sp.	20,45 ± 1,53 a	104,36 ± 13,89 a	47,07 ± 6,69 ab
Fabaceae (n = 3)	<i>Trifolium repens</i>	29,49 ± 6,26 a	130,05 ± 12,67 a	58,76 ± 5,48 a
	<i>Trifolium repens</i> + α-cellulose	28,15 ± 5,97 a	124,13 ± 12,09 a	56,09 ± 5,23 ab
Salicaceae (n = 3)	<i>Salix</i> sp.	27,18 ± 1,81 a	118,94 ± 8,08 a	58,23 ± 4,38 ab
Test statistique		F = 1,69 <i>p</i> > 0,2284	F = 3,29 <i>p</i> = 0,06	F = 5,19 <i>p</i> = 0,016

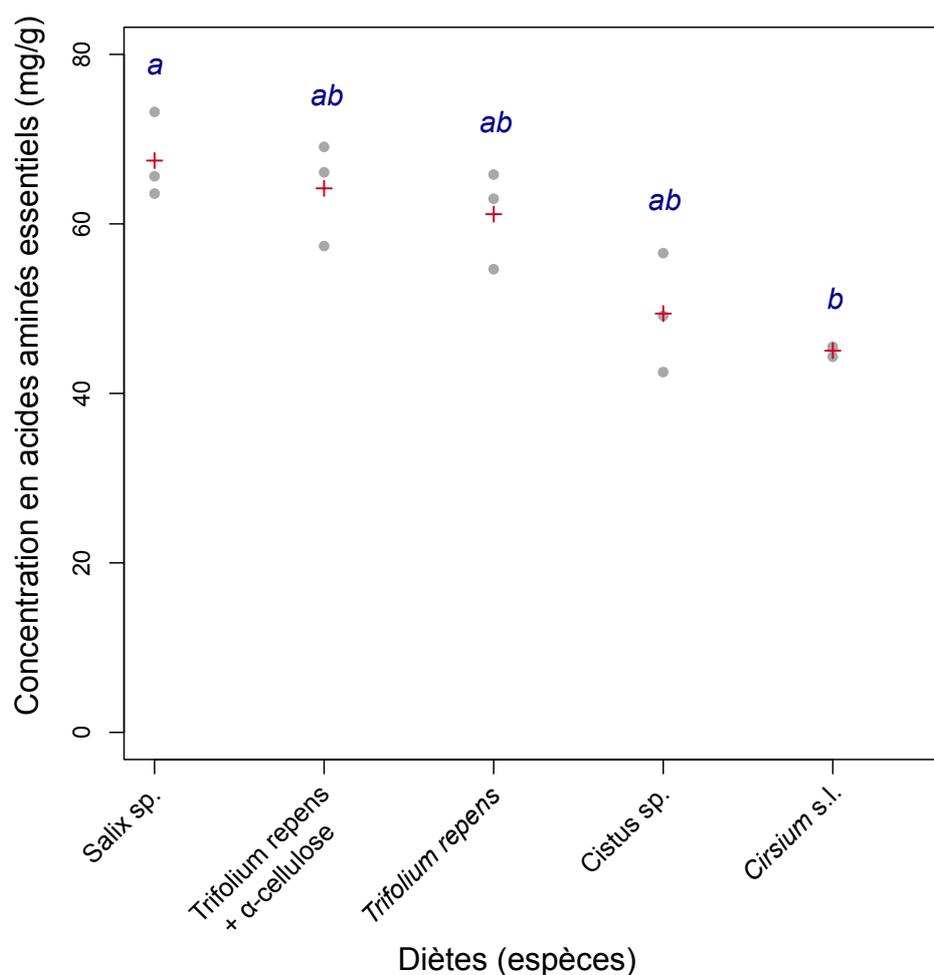


Figure 22. Nuage de points de la concentration en acides aminés essentiels des différentes diètes. Les points représentent les différentes répliques et la croix représente la moyenne des mesures. Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples, deux diètes partageant le même indice ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre.

La composition en acides aminés essentiels diffère significativement entre les diètes utilisées lors des élevages ($F = 11,08$; $p = 0,002$). Les comparaisons multiples indiquent que seules les diètes à base de trèfle ne diffèrent pas l'une de l'autre dans leur composition ($F = 0,36$; $p = 0,589$) (Annexe 4). La représentation nMDS à trois dimensions corrobore ces résultats, les diètes se distinguent bien les unes des autres, hormis les deux diètes à base de *Trifolium repens* qui se chevauchent (Stress value = 0,01 ; $R^2 = 0,99$) (Fig. 23).

Bien qu'aucun composé indicateur n'ait été détecté, l'espace des variables suggère que la diète de *Cirsium s.l.* est caractérisée par une teneur plus forte en histidine alors que celle de *Salix sp.* est caractérisée par de la leucine et de la méthionine. La diète de *Cistus sp.* est quant à elle caractérisée par l'arginine, riche en azote. Enfin, les diètes de *Trifolium repens* sont caractérisées par l'isoleucine, la phénylalanine et la valine (Fig. 24).

La diète à base de *Salix sp.* est la seule à présenter de la proline, absente du profil en acides aminés des autres diètes.

La teneur en aspartate et glutamate diffère significativement entre les différentes diètes polliniques ($F = 13,41$; $p < 0,001$). Alors que les diètes de *Salix sp.* et de *Cirsium s.l.* possèdent la moins grande teneur en ces deux acides aminés, les diètes de *Cistus sp.* et *Trifolium repens* en sont plus riches.

Stress value = 0.01
R = 0.99

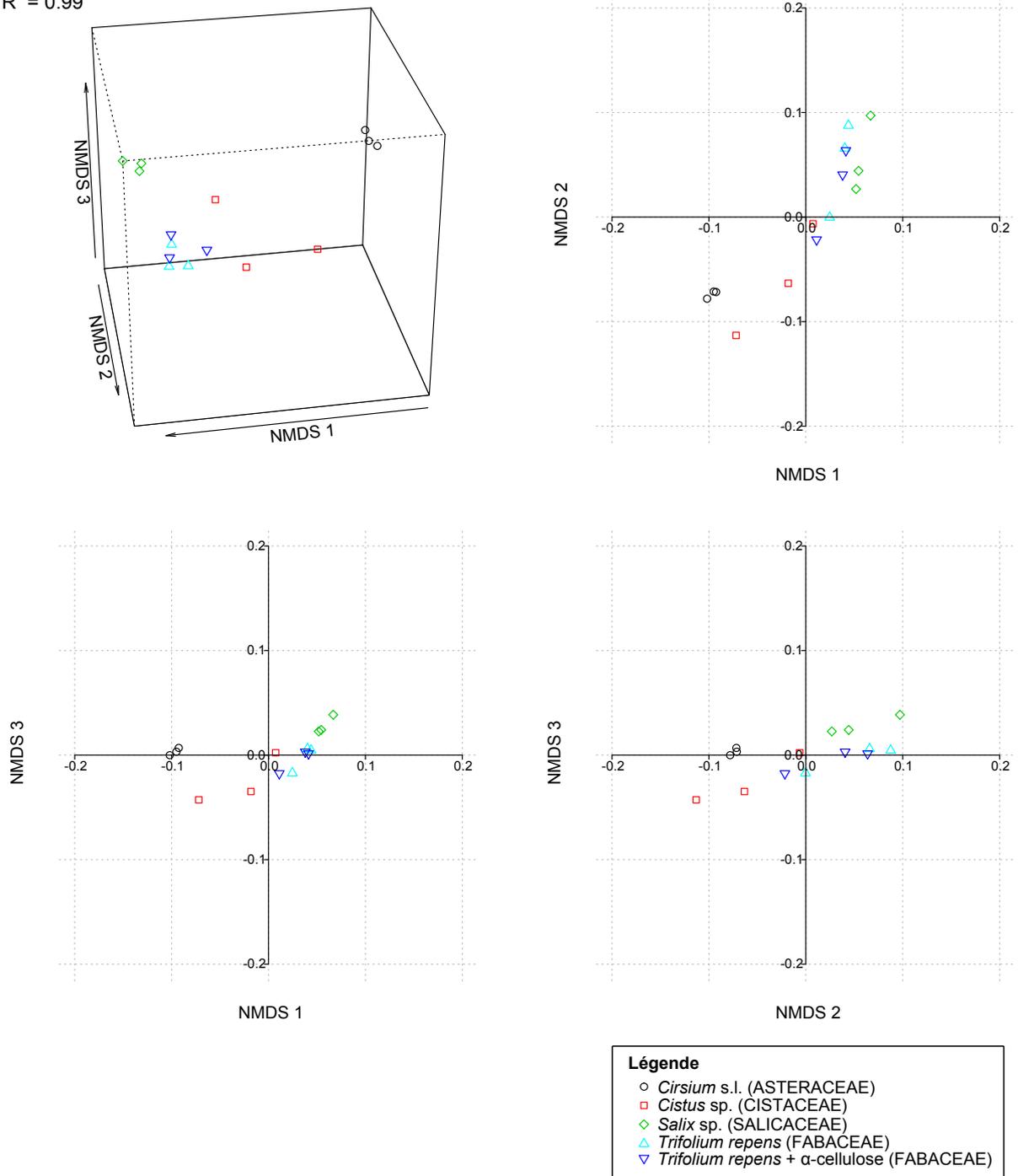


Figure 23. Représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur les quantités absolues des acides aminés essentiels (mg/g) dans les différentes diètes utilisées pour l'élevage. Chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité : plus des points sont distants, plus leurs compositions en acides aminés essentiels sont différentes.

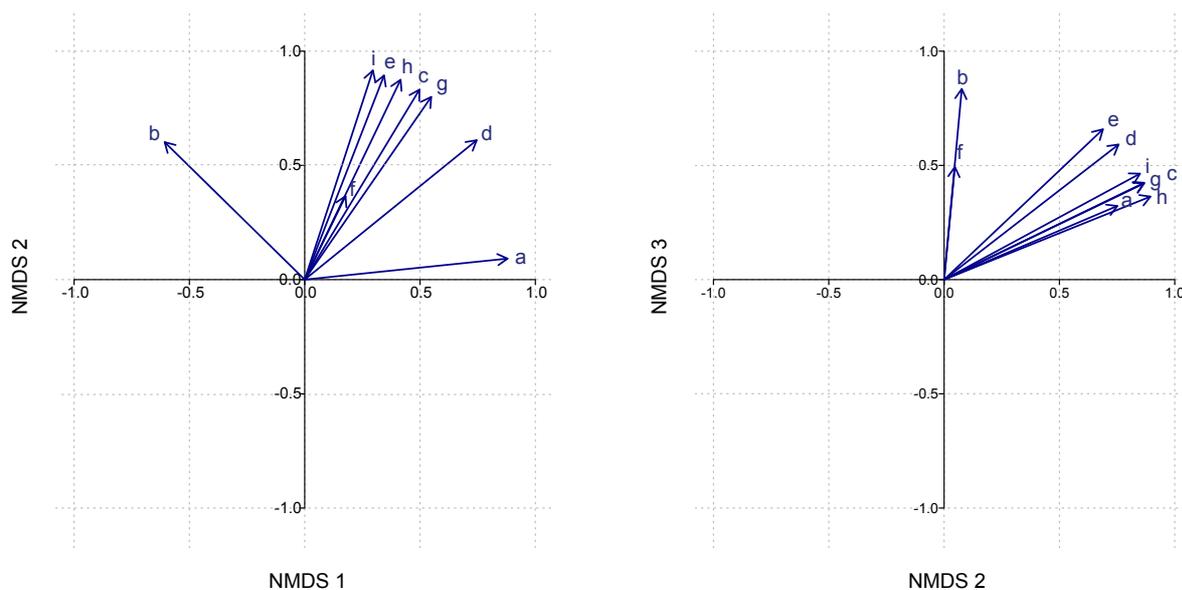


Figure 24. Les trois axes de la représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des acides aminés essentiels (mg/g) dans les différentes diètes utilisées pour l'élevage. Dans l'espace des variables, chaque vecteur représente un acide aminé essentiel: a, arginine; b, histidine; c, isoleucine; d, leucine; e, lysine; f, méthionine; g, phénylalanine; h, thréonine et i, valine.

3.2.2.2. Composition stérolique

Du point de vue stérolique, les trois composés les plus abondants dans les diètes de *Cistus* sp., *Salix* sp. et *Trifolium repens* sont le 24-méthylènecholestérol/campestérol, le β -sitostérol et le $\delta 5$ -avenastérol. Le profil stérolique de la diète de *Cirsium* s.l. est caractérisé par les stérols majeurs suivants : le cholestérol, le β -sitostérol ainsi que le $\delta 7$ -avenastérol (Table 14).

La teneur des différents composés varie entre les diètes étudiées (Table 14). Ainsi, le profil de la diète de *Cirsium* s.l. est sensiblement différent des autres diètes. Le $\delta 7$ -avenastérol y est présent en forte proportion (près de 60%) alors qu'il est absent dans les autres diètes. De manière semblable, le cholestérol est présent dans la diète d'Asteraceae (13%) et n'est pas détecté dans les autres diètes. Le β -sitostérol, troisième composé majoritaire dans la diète de *Cirsium* s.l. est retrouvé dans toutes les diètes, en proportion variable.

Table 14. Compositions stéroliques des cinq diètes. Les proportions individuelles de chacun des composés sont exprimées en pourcentage de la composition stérolique totale (moyenne \pm écart-type), la concentration en stérols totaux est exprimée en mg par g de candi frais (moyenne \pm écart-type). Les trois stérols majoritaires pour chacune des diètes sont en gras. N.D. : non détecté. ^aSous les conditions analytiques appliquées, le campestérol et le 24-méthylènecholestérol sont impossibles à séparer. * Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples sur les concentrations stéroliques totales suite au test de l'ANOVA ($F = 13,64$; $p < 0,001$).

Stérol	<i>Cirsium s.l.</i> (n = 3)	<i>Cistus sp.</i> (n = 3)	<i>Salix sp.</i> (n = 3)	<i>Trifolium repens</i> (n = 3)	<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose (n = 3)
Cholestérol	13,31 \pm 17,15	0,92 \pm 0,28	0,72 \pm 0,42	0,91 \pm 0,37	0,91 \pm 0,37
Desmostérol	0,49 \pm 0,42	N.D.	0,11 \pm 0,05	N.D.	N.D.
24-méthylènecholest./ campestérol ^a	1,72 \pm 0,15	7,71 \pm 1,17	54,29 \pm 4,57	44,86 \pm 1,54	44,86 \pm 1,54
Stigmastérol	2,06 \pm 0,88	3,81 \pm 3,87	2,10 \pm 0,12	0,54 \pm 0,15	0,54 \pm 0,15
β -sitostérol	11,66 \pm 5,44	54,31 \pm 3,33	22,52 \pm 3,69	8,69 \pm 1,25	8,69 \pm 1,25
δ 5-avenastérol	4,78 \pm 2,84	31,58 \pm 0,81	15,79 \pm 2,51	39,47 \pm 3,04	39,47 \pm 3,04
Cholesténone	3,72 \pm 1,57	0,09 \pm 0,04	F.D.	0,05 \pm 0,05	0,05 \pm 0,05
δ 7-stigmastérol	2,67 \pm 1,09	1,58 \pm 1,42	4,46 \pm 3,45	5,50 \pm 4,97	5,50 \pm 4,97
δ 7-avenastérol	59,58 \pm 24,24	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
TOTAL* (mg/g de matière fraîche)	1,94 \pm 0,06 b	3,13 \pm 0,51 b	8,72 \pm 1,87 a	3,12 \pm 1,42 b	2,98 \pm 1,36 b

La composition en stérols diffère significativement entre les diètes ($F = 15,19$; $p < 0,001$). Les comparaisons multiples indiquent que toutes les diètes diffèrent significativement les unes des autres sauf la diète de *Trifolium repens* qui ne diffère ni de la diète de trèfle dilué ($F = 0,01$; $p = 0,601$) ni de la diète de ciste ($F = 27,69$; $p = 0,062$) (Annexe 4).

La représentation nMDS en trois dimensions montre que la diète de *Cirsium s.l.* est bien distinctes des autres (Stress value = 0,039 ; $R^2 = 0,992$) (Fig. 25). Bien qu'aucun composé indicateur n'ait été mis en évidence, l'orientation des vecteurs suggère que le pollen de *Cirsium s.l.* est caractérisé par le cholesténone et le δ 7-avenastérol selon les axes NMDS 1 et 2 mais également 2 et 3 (Fig. 26). Les diètes de *Salix sp.* et de *Trifolium repens* sont quant à elles caractérisées par le 24-méthylènecholestérol/campestérol et le δ 5-avenastérol.

En ce qui concerne la teneur en stérols totaux, l'ANOVA détecte une différence significative entre les différentes diètes ($F = 13,64$; $p < 0,001$). Le test post-hoc indique que la diète de *Salix sp.* présente une concentration stérolique totale significativement supérieure aux autres diètes qui ne diffèrent pas entre elles (Table 14).

Stress value = 0.11
R = 0.94

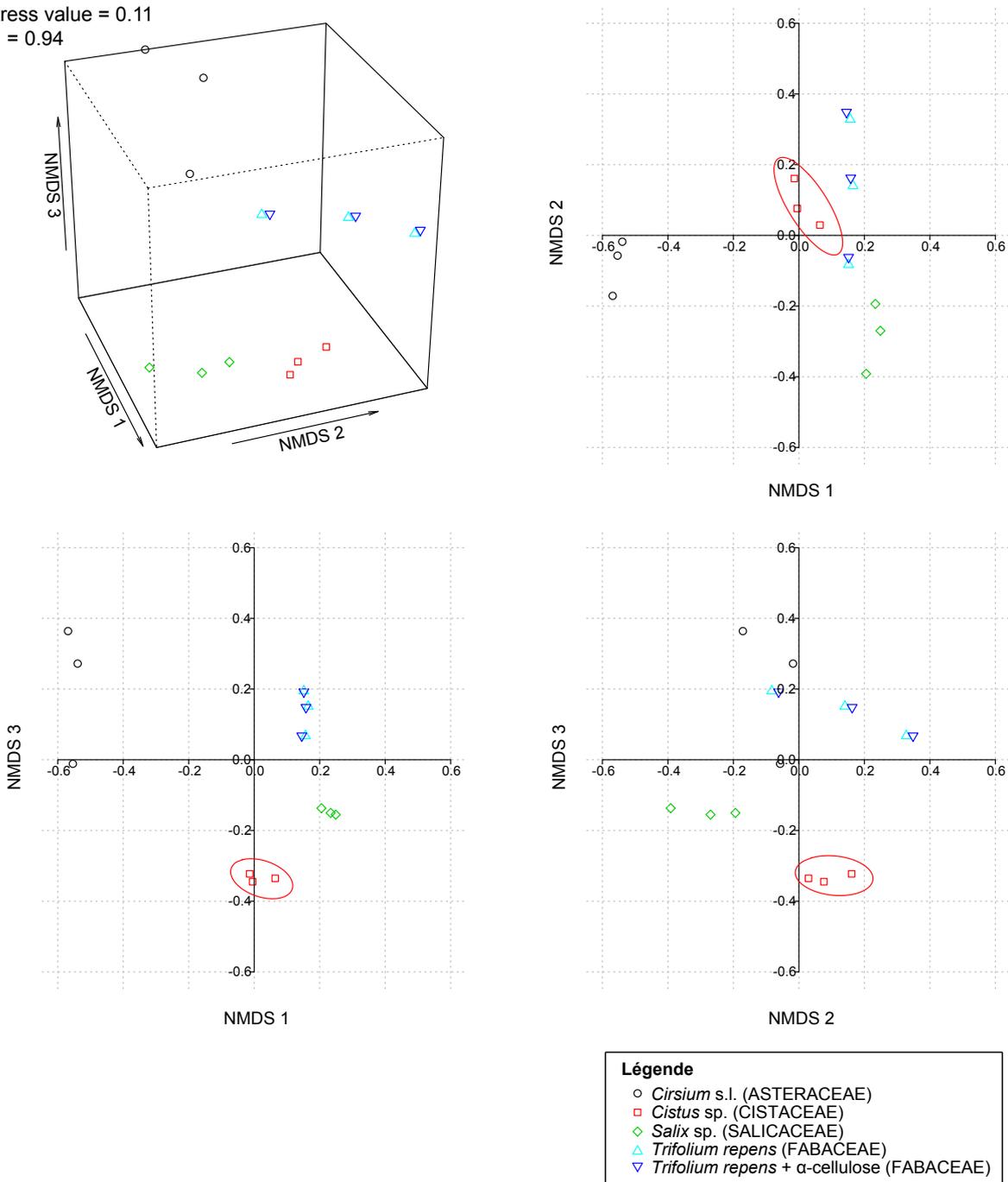


Figure 25. Représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des composés stéroliques (mg/g) dans les différentes diètes utilisées pour l'élevage. Chaque point représente un échantillon. La distance entre deux points reflète leur dissimilarité : plus des points sont distants, plus leurs compositions stéroliques sont différentes.

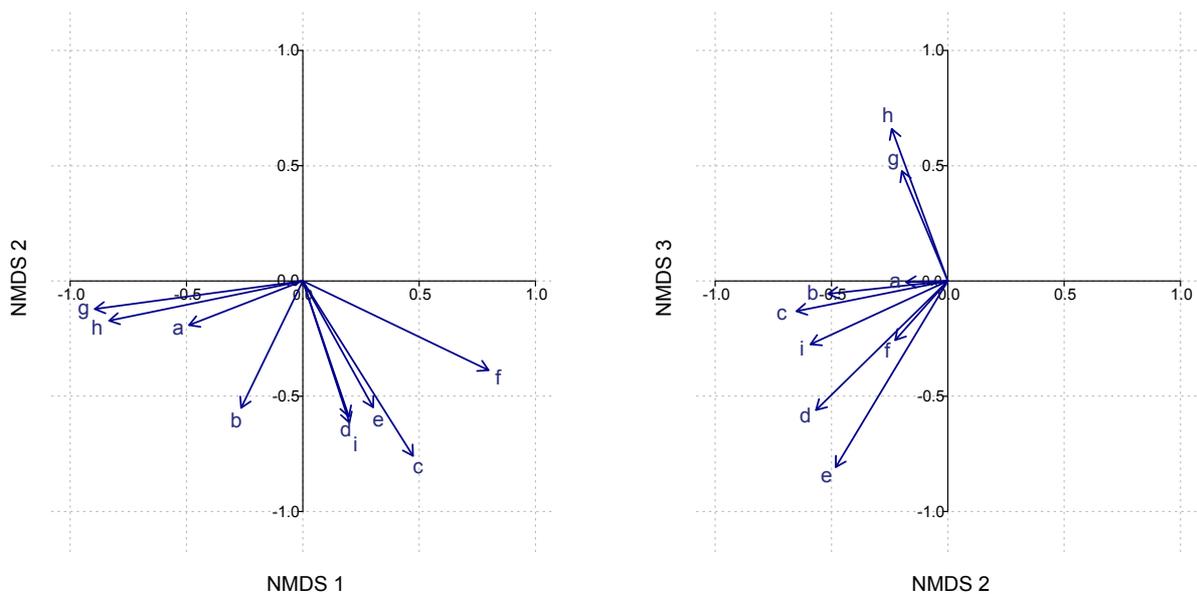


Figure 26. Les trois axes de la représentation nMDS basée sur les distances de Bray-Curtis calculées sur l'abondance des composés stéroliques (mg/g) dans les différentes diètes. Dans l'espace des variables, chaque vecteur représente un composé stérolique : a, cholestérol ; b, desmostérol ; c, 24-méthylènecholestérol/campestérol ; d, stigmastérol ; e, β -sitostérol ; f, δ 5-avenastérol ; g, cholesténone ; h, δ 7-avenastérol et i, δ 7-stigmastérol.

3.2.2.3. Alcaloïdes

Les pollens utilisés dans la confection des candis ne contiennent pas d'alcaloïdes. De même, aucun alcaloïde n'a été détecté dans les échantillons issus des micro-colonies à savoir les larves, le contenu de leurs tubes digestifs, les ouvrières et leurs déjections.

4. Discussion

4.1. Paradoxe des Asteraceae et protection du pollen

Les analyses des pollens des différentes espèces florales mettent en évidence des caractéristiques particulières dans la composition chimique du pollen d'Asteraceae : (i) une concentration faible en acides aminés totaux et essentiels ; (ii) des composés chimiques rares potentiellement toxiques (δ^7 -stérols et alcaloïdes) ; (iii) une relativement grande variabilité interspécifique de plusieurs composés chimiques.

Les espèces d'Asteraceae étudiées présentent toutes du pollen avec des teneurs en acides aminés totaux et essentiels inférieures à celles des autres espèces analysées. Ces résultats corroborent les travaux de Weiner *et al.* (2010) mettant en évidence que les plantes visitées par des abeilles oligolectiques, notamment des Asteraceae, arborent un pollen moins riche en acides aminés (i.e. totaux et essentiels) que les plantes visitées par des espèces polylectiques. En outre, parmi les pollens analysés dans ce travail, neuf sont particulièrement riches en polypeptides (i.e. teneur de 130 - 225 mg/g de masse sèche) dont trois provenant d'espèces d'Asteraceae (i.e. *Aster tripolium*, *Helianthus annuus* et *Hypochoeris radicata*). A l'inverse, d'autres pollens floraux appartenant tous à la famille des Asteraceae présentent des valeurs très basses. Cette première catégorie de nutriments souligne la complexité chimique de la famille des Asteraceae qui présente à elle seule une variabilité chimique impressionnante. Bien qu'aucune étude ciblée sur les polypeptides du pollen n'ait encore été réalisée sur les Asteraceae, Roulston *et al.* (2000) ont mis en évidence la variabilité des teneurs en protéines brutes du pollen de diverses espèces d'Asteraceae (i.e. de 12 à 34%); ces deux classes de nutriments étant apparentées.

D'un point de vue stérolique, la teneur en stérols semble globalement faible bien que certaines espèces telles que *Hypochoeris radicata* soient plus riches en stérols. De manière générale, les espèces appartenant aux Asteraceae contiennent relativement moins de stérols bénéfiques que les autres familles analysées, au profit de phytostérols moins usuels tels que les δ^7 -stérols. Ce trait n'est pas caractéristique des Asteraceae puisque des espèces appartenant à d'autres familles en présentent également dans leur pollen (i.e. *Hedera helix* et *Medicago sativa*). Cependant, les proportions de ces composés stéroliques peuvent atteindre jusqu'à 80% chez les Asteraceae étudiées à ce jour (i.e. *Helianthus annuus*). D'autres analyses effectuées sur du pollen de type Asteraceae mettent également en exergue une présence massive de δ^7 -stérols (Vanderplanck, 2013). Outre les composés en δ^7 récurrents dans le pollen des Asteraceae, il est intéressant de noter que le pollen d'*Hypochoeris radicata* est riche en cholestérol, généralement très peu synthétisé par les plantes (Barbier, 1966 ; Simal *et al.*, 1988 ; Behmer & Nes, 2003; Rasmont *et al.*, 2005 ; Vanderplanck, 2013). Les abondances relatives diffèrent donc d'une espèce à l'autre au sein de cette famille, générant des profils stéroliques quelque peu distincts.

Par ailleurs, plusieurs espèces d'Asteraceae sont connues pour présenter des alcaloïdes pyrrolizidiniques dans leurs pollens (Anke *et al.*, 2004). Cependant, parmi les modèles d'Asteraceae investigués, seul le *Senecio inaequidens* semble produire du pollen potentiellement toxique de par la présence d'alcaloïdes. Contrairement aux travaux de Kempf

et al. (2010) sur l'ensemble de la plante, aucun alcaloïde n'a été détecté dans le pollen floral de *Senecio jacobaea* alors que les plantes de la tribu des Senecioneae sont connues pour présenter des alcaloïdes pyrrolizidiniques. De plus, la présence de composés secondaires de type alcaloïdes ne semble pas être une signature chimique propre aux Asteraceae étant donné qu'ils sont également retrouvés dans quatre autres familles d'Angiospermes ; à savoir les Boraginaceae, les Apocynaceae, les Fabaceae et les Ranunculaceae (Hartmann & Ober, 2000).

Les alcaloïdes ne sont pas les seuls métabolites pouvant être impliqués dans la toxicité des pollens. En effet, d'autres composés naturellement produits par les plantes sont connus pour être utilisés dans la défense contre l'herbivorie (e.g. saponines, lactones sesquiterpéniques) (Detzel & Wink, 1993 ; Jordon-Thaden & Louda, 2003 ; Wink, 2003 ; Mithöfer & Boland, 2012 ; Wink, 2013). Parmi eux, les lactones sesquiterpéniques sont connues pour affecter les insectes phytophages et sont notamment présentes dans les Asteraceae (Isman, 1985 ; Landau *et al.*, 1994 ; Castillo *et al.*, 1998 ; Heinrich *et al.*, 1998). Par ailleurs, certains pollens d'Asteraceae sont connus pour être riches en pigments qui pourraient avoir des effets négatifs sur les abeilles (Praz *et al.*, 2008).

Toutes ces caractéristiques chimiques mises en évidence chez diverses espèces d'Asteraceae ainsi que la variabilité les caractérisant influent probablement sur les abeilles qui en exploitent le pollen. Ainsi, bien qu'aucune carence en un ou plusieurs acides aminés n'ait pu être mise en évidence au sein des Asteraceae, la teneur globalement plus faible en acides aminés essentiels pourrait être délétère pour les abeilles (Cook *et al.* 2003). En effet, étant donné que les abeilles sont incapables de synthétiser ces acides aminés essentiels, il est primordial qu'elles les puisent dans les ressources florales. Par ailleurs, la consommation de ressources pauvres en protéines tend à produire des abeilles plus petites ayant un fitness plus faible (Roulston & Cane, 2002). De plus, plusieurs études ont mis en évidence l'importance des protéines dans l'immuno-compétence et la résistance des abeilles domestiques aux maladies (Mattila & Otis, 2006 ; Alaux *et al.*, 2010). Les pollens plus pauvres présentent donc une qualité nutritionnelle moindre pour les abeilles.

En outre, certains stérols (i.e. 24-méthylènecholestérol, β -sitostérol et δ 5-avénastérol) sont connus pour être associés au bon développement larvaire des bourdons (Vanderplanck *et al.*, 2014b). Or, les espèces appartenant aux Asteraceae en contiennent relativement moins que les espèces d'autres familles, au profit de phytostérols moins usuels tels que les δ 7-stérols potentiellement préjudiciables pour certaines espèces d'abeilles (i.e. généralistes) (Vanderplanck *et al.*, 2014b). Aucune étude n'a clairement montré l'influence de tels composés sur la physiologie des abeilles mais certaines études sont disponibles sur les insectes herbivores tels que *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae), qui n'est pas capable d'utiliser les δ 7-stérols, évitant les plantes riches en ces composés (Clark & Bloch, 1959 ; Behmer *et al.*, 1999a, b). De plus, Behmer & Nes (2003) suggèrent que le profil en phytostérols puisse jouer un rôle de défense contre les insectes herbivores et induire un comportement de mélange des ressources chez les insectes généralistes. Par ailleurs, des études sur les échinodermes ont montré un lien entre la présence de δ 7-stérols dans leurs épidermes et une production massive de saponines (Gaoud *et al.*, 1972 ; Cordeiro & Djerassi,

1990 ; Kicha *et al.*, 2001). Ces saponines sont utilisées comme moyen de défense chimique contre leurs prédateurs en destabilisant la perméabilité des membranes cellulaires, les échinodermes étant protégés de leur propre toxicité grâce aux $\delta 7$ -stérols particuliers de leur membrane. De ce fait, il est probable que la présence des $\delta 7$ -stérols dans le pollen d'Asteraceae puisse être indicatrice de la présence de saponines. Les abeilles spécialisées sur du pollen riche en $\delta 7$ -stérols, et donc potentiellement riche en saponines, seraient capables d'inclure ces stérols dans leurs membranes et d'être ainsi protégées contre la toxicité des saponines. A l'inverse, les insectes généralistes, incapables d'insérer ces stérols dans leurs tissus, seraient donc sujets à la toxicité des saponines. Des études de composition stérolique des tissus d'espèces spécialistes et généralistes élevées sur du pollen d'Asteraceae permettraient d'affirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Bien qu'aucune analyse n'ait été menée sur les saponines dans le cadre de ce travail, ces molécules seraient donc de bons candidats dans la contrainte de toxicité du pollen d'Asteraceae. Plusieurs études ont révélé leur abondance dans les parties végétatives de diverses plantes dont les Asteraceae (Oakenfull, 1981 ; Osbourn, 1996 Waller & Yamasaki, 1996 ; Francis *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2004 ; Calabria *et al.*, 2008). Ces saponines auraient un rôle de défense contre les champignons ainsi qu'une activité antibiotique et toxique pour les insectes, notamment de par leur interférence avec la digestion de divers composés dont les stérols (Oakenfull, 1982 ; Jenkins & Atwal, 1994 ; Milgate & Roberts, 1995 ; Osbourn, 1996). Ces composés pourraient donc être impliqués dans la protection du pollen des Asteraceae en limitant la collecte.

La présence de composés toxiques secondaires dans le pollen semble clairement dissuader les abeilles à le consommer (Detzel & Wink, 1993). Ainsi, les composés de type alcaloïdes semblent présenter des effets négatifs sur les insectes généralistes dont les abeilles mellifères (Reinhard *et al.*, 2009). Dans certains cas, la consommation de pollen toxique affecte le développement des larves mais également la santé des adultes de certaines espèces (Praz *et al.*, 2008). Cependant, les concentrations naturelles ne semblent pas nécessairement être létales pour les abeilles (Sedivy *et al.*, 2012). De plus, ils peuvent réduire l'absorption de composés nutritifs tels que les stérols, ayant ainsi un impact sur le métabolisme des insectes (Weissenberg *et al.*, 1998). Comme chez les vertébrés, les alcaloïdes sont également connus pour agir sur les récepteurs à acétylcholine, ce qui influe sur les fonctions musculaires et nerveuses ainsi que sur les fonctions de biosynthèse protéique (Wink, 1998). De manière étonnante, la présence de tels composés peut parfois s'avérer bénéfiques pour le pollinisateur en réduisant sa sensibilité aux infections (Manson *et al.*, 2010).

4.2. Influence d'une diète riche en Asteraceae sur le développement de *Bombus terrestris*

L'élevage montre clairement que le pollen d'Asteraceae constitue une diète non bénéfique pour le développement des micro-colonies de bourdons. Ces résultats concordent avec les études de Génissel *et al.* (2002) et de Tasei & Aupinel (2008a), soulignant que les diètes contenant du pollen d'Asteraceae sont associées à un moins bon développement, bien que les mélanges semblent réduire cet effet (Tasei & Aupinel, 2008a).

Ainsi, différents paramètres relatifs au développement larvaire (i.e. nombre et masse des larves) témoignent de l'impact négatif de la diète composée exclusivement du pollen de

type *Cirsium* (i.e. Asteraceae). *In fine*, moins de larves ont été produites et ce, avec une masse réduite comparé à la diète de *Salix* sp., suggérant un retard dans la dynamique de développement des micro-colonies. L'efficacité pollinique étant directement dépendante du contenu nutritif du pollen, la plus faible valeur est observée pour la diète composée exclusivement de pollen de *Cirsium* s.l.

Cette étude confirme que la composition pollinique, et donc chimique, d'une diète influe sur le développement des micro-colonies (Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008a). Contrairement à plusieurs études, la quantité de pollen collectée dépend ici de la composition chimique de la diète (Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008a ; Basualdo *et al.*, 2013 ; Vanderplanck *et al.*, 2014b). En effet, une quantité plus faible de pollen d'Asteraceae a été collectée par les ouvrières. De plus, une collecte de sirop plus importante semble compenser partiellement une diète de contenu nutritionnel moindre (Vanderplanck *et al.*, 2014b).

L'étude de contraintes intrinsèques au pollen permet de comprendre les raisons du mauvais développement de certaines micro-colonies. Tout d'abord, la digestibilité du pollen varie selon l'espèce florale dont il est issu. Les nutriments se retrouvent dans le protoplasme, bien protégé par deux couches, l'intine et l'exine. Cette dernière reste intacte après la digestion du pollen (Suárez-Cervera *et al.*, 1994). Dans certains cas, elle est plus épaisse, rendant la digestion difficile. Le choc osmotique nécessaire à la destruction de la paroi des grains de pollen n'est pas suffisant et ne permet donc pas de récupérer les nutriments (Roulston & Cane, 2000). De manière intéressante, une proportion importante de grains non digérés du pollen de *Taraxacum* (Asteraceae) a été retrouvée dans les fèces d'ouvrières d'*Apis mellifera* (Peng *et al.*, 1985). Notre étude corrobore ces résultats avec du pollen de type *Cirsium* (Asteraceae) dans le cadre d'élevages réalisés avec *Bombus terrestris*. Ainsi, l'échec de certaines abeilles à se développer sur le pollen d'Asteraceae (i.e. *Bupthalmum* sp. et *Tanacetum vulgare*) serait probablement lié à des difficultés d'extraction des nutriments du protoplasme de ce type de pollen (Praz *et al.*, 2008 ; Sedivy *et al.*, 2011). Par ailleurs, comme suggéré par Praz *et al.* (2008), la digestibilité peut être influencée par des composés présents dans le pollen lui-même. Ainsi, la consommation d'alcaloïdes de type harmine par les larves de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) se traduit par de sévères réductions dans ses contenus en protéines, glycogène et lipides. De plus, l'activité de l'enzyme digestive α -amylase est fortement réduite (Bouayad *et al.*, 2012). La présence d'autres composés du pollen pourrait également être responsable de dérèglements physiologiques perturbant la digestion. Cependant, aucune étude approfondie n'a été menée à l'heure actuelle. Par ailleurs, le pollenkit (i.e. manteau pollinique) présent au niveau du pollen des Asteraceae ou les composés chimiques qui s'y retrouvent, pourraient interférer avec le processus d'assimilation des nutriments rendant la digestion difficile (Williams, 2003 ; Praz *et al.*, 2008).

D'un point de vue contenu nutritif, comme les diètes étudiées présentaient une teneur en polypeptides similaire (i.e. pas de différence significative), l'hypothèse du déficit nutritionnel pour cette classe de composés peut être écartée. Ce composé nutritif crucial ne constitue donc pas un facteur limitant dans ce cas d'étude. Il en est de même pour la teneur en acides aminés totaux (i.e. liés et libres). En effet, malgré la dilution avec l' α -cellulose, les

micro-colonies se sont développées normalement. Ces traits nutritionnels (i.e. contenus en acides aminés totaux et polypeptides) ne sont probablement pas responsables de la faible performance observée pour la diète d'Asteraceae dans cette étude. Cependant, les pollens étudiés diffèrent fortement dans leur teneur en acides aminés essentiels. Parmi les cinq diètes polliniques, la diète de *Cirsium* s.l. dispose de la plus faible concentration en acides aminés essentiels, tout en étant celle qui supportait le moins bien le développement des micro-colonies. Or, d'après les travaux de Cook *et al.* (2003), un pollen bénéfique pour les abeilles contient de grandes quantités en acides aminés essentiels. Cet élément pourrait expliquer en partie le faible développement des micro-colonies.

Lorsque la composition en phytostérols est comparée avec l'efficacité du pollen, il s'avère que le 24-méthylènecholestérol, le β -sitostérol et le δ 5-avénastérol apparaissent comme étant positivement associés au développement larvaire des bourdons. Ces résultats sont confirmés par les travaux de Vanderplanck *et al.* (2014b). Par ailleurs, il est maintenant clairement établi que le 24-méthylènecholestérol est le précurseur de la makistéron A (i.e. 24-méthyl-20-hydroxyecdysone), un ecdystéroïde à 28 atomes de carbone isolé des ovarioles d'*Apis mellifera*, espèce polylectique (Feldlaufer *et al.*, 1986a,b). Par conséquent, le 24-méthylènecholestérol est un stérol essentiel dans le métabolisme de cette espèce influençant la mue et le développement des ovarioles (Svoboda *et al.*, 1978 ; Svoboda *et al.*, 1983 ; Human *et al.*, 2007). Alors que le β -sitostérol est connu pour avoir des effets anti-appétants sur l'abeille domestique, il semble avoir l'effet inverse sur *Bombus terrestris* qui collecte massivement le pollen d'*Arbutus unedo* particulièrement riche en β -sitostérol (Rasmont *et al.*, 2005). Ce phytostérol ainsi que le δ 5-avénastérol semblent être impliqués dans certaines voies métaboliques de *B. terrestris* ou avoir un effet phago-stimulant sur cette espèce de bourdon (Regali, 1996). De plus, des phytostérols ont été décrits comme étant des stimuli du comportement de récolte chez *A. mellifera* (Louveaux, 1959 ; Pernal & Currie, 2002). Bien que le β -sitostérol constitue le troisième composé stérolique le plus abondant de la diète de *Cirsium* s.l., les teneurs en 24-méthylènecholestérol et δ 5-avénastérol sont nettement plus faibles que pour les autres diètes. Une plus faible concentration en ces phytostérols pourrait expliquer le plus faible développement des micro-colonies élevées sur la diète de *Cirsium* s.l. Cette dernière se distingue des autres diètes également de par sa plus forte concentration en δ 7-avénastérol qui pourrait, elle aussi, être à l'origine d'un plus faible développement des micro-colonies élevées sur le pollen d'Asteraceae. De manière similaire, le développement des micro-colonies sur une diète de *Calluna vulgaris*, contenant une proportion non négligeable de δ 7-stérols (i.e. 20% δ 7-avénastérol), semble moins important comparé aux autres pollens testés (excepté *Cistus* sp.) (Vanderplanck *et al.*, 2014). De manière similaire, Génissel *et al.* (2002) ont mis en évidence un faible développement des colonies de bourdons sur du pollen d'*Helianthus annuus*, pollen se révélant également riche en δ 7-stérols. Comme suggéré par Vanderplanck (2013), ces stérols pourraient être préjudiciables pour les bourdons mais seraient potentiellement impliqués dans l'attraction de pollinisateurs plus spécialisés (e.g. espèces du groupe de *Colletes succinctus* exploitant des pollens riches en δ 7-stérols).

Certains pollens sont connus pour présenter des composés secondaires potentiellement toxiques pour certaines espèces abeilles (Detzel & Wink, 1993 ; Wink, 2003 ; Wink, 2013). Les abeilles pourraient donc être confrontées à des métabolites secondaires auxquels elles ne

sont pas adaptées. Bien que nos analyses n'aient détecté aucun alcaloïde dans les diètes utilisées pour les élevages, d'autres composés (e.g. saponines ou lactones sesquiterpéniques) pourraient y être retrouvés et expliquer le moins bon développement des micro-colonies sur la diète de *Cirsium* s.l. En effet, de tels composés secondaires sont connus pour affecter les insectes herbivores (Isman, 1985 ; Landau *et al.*, 1994 ; Castillo *et al.*, 1998 ; Heinrich *et al.*, 1998 ; Jordon-Thaden & Louda, 2003 ; Mithöfer & Boland, 2012). Par ailleurs, Xu *et al.* (2013) ont mis en évidence une plus faible capacité de détoxification chez certaines abeilles dont *Bombus terrestris*. Le niveau de diversité et d'expression des gènes de détoxification varie en fonction du stade de développement des individus. Alors que les niveaux les plus élevés de ces gènes sont exprimés chez les femelles adultes (i.e. reines et ouvrières), ils sont les plus bas pour les larves, les pupes et les mâles adultes. Une telle induction réduite des voies de détoxification pourrait potentiellement expliquer le mauvais développement des abeilles élevées sur du pollen riche en composés secondaires (Praz *et al.*, 2008).

Bien qu'aucune contrainte de toxicité liée aux alcaloïdes n'ait pu être mise en évidence, notre étude suggère que la production de larves plus petites dans les micro-colonies élevées sur le *Cirsium* s.l. pourrait être liée à la faible digestibilité de ce pollen ainsi qu'à une forte proportion de δ^7 -stéroïdes et une plus faible teneur en acides aminés essentiels. Cet effet délétère du pollen d'Asteraceae est en accord avec des études similaires ayant démontré que le pollen d'Asteraceae affecte la croissance larvaire des abeilles (Williams, 2003 ; Praz *et al.*, 2008 ; Sedivy *et al.*, 2011). Par ailleurs, Sedivy *et al.* (2011) suggèrent que des adaptations physiologiques sont requises pour digérer ce type de pollen mais aucune étude approfondie n'a été menée à l'heure actuelle. De telles adaptations seraient probablement répandues chez les abeilles, façonnant les interactions plantes-abeilles (Opitz & Müller, 2009).

Bien que nos observations aient été établies sur base de micro-colonies, elles peuvent être inférées aux colonies rencontrées *in natura*. En effet, une étude a montré que les micro-colonies peuvent être assimilées à des colonies entières lorsque les effets des diètes polliniques sont testés en conditions de laboratoire (i.e. avec une nourriture *ad libitum*, température et humidité contrôlées) (Tasei & Aupinel, 2008a). Par conséquent, notre étude démontre que la digestibilité ainsi que la composition chimique du pollen influencent la taille ainsi que le nombre de descendants, et donc potentiellement le fitness des colonies de *B. terrestris*. En effet, des ouvrières plus petites sont moins efficaces lors du butinage et de la récolte de pollen que de plus gros individus, ramenant plus de nectar par unité de temps, collectant plus de pollen, volant à des températures plus fraîches, pénétrant des fleurs plus profondes et étant potentiellement moins sujets à la prédation (Free & Butler, 1959 ; Goulson *et al.*, 2002 ; Spaethe & Weidenmüller, 2002 ; Peat *et al.*, 2005 ; Couvillon & Dornhaus, 2010 ; De Luca *et al.*, 2013). La taille des ouvrières est aussi positivement corrélée au nombre de cellules d'œufs et d'ouvrières produites (Cnaani & Hefetz, 1994), alors que des reines plus grandes ont de plus grandes chances de survie en hibernation ainsi qu'un plus grand succès reproducteur (Beekman & Van Stratum, 1998 ; Beekman *et al.*, 1998).

Toutefois, des expérimentations avec des colonies de taille réelle et en milieu naturel permettraient de valider nos hypothèses dans un contexte de variation naturelle de la composition de la diète pollinique, en prenant en compte le choix des ressources par les

bourdons et les effets liés au polylectisme (i.e. diminution de la toxicité de certains pollens suite au mélange avec d'autres pollens moins toxiques). En effet, des études ont mis en évidence la capacité des bourdons à estimer la qualité nutritive des ressources, et plus particulièrement du pollen (Robertson *et al.*, 1999 ; Leonhards & Blüthgen, 2012). Ils peuvent ainsi éviter les pollens de moindre qualité ou toxiques (Williams, 2003; Praz *et al.*, 2008; Sedivy *et al.*, 2011). Par ailleurs, Eckhardt *et al.* (2013) suggèrent que le polylectisme est une stratégie possible pour compléter ou atténuer les propriétés défavorables du pollen. En effet, les bourdons généralistes exploitent fréquemment des fleurs de différentes espèces florales. De ce fait, leurs larves consomment souvent des mélanges de pollen et non du pollen pur. Ce comportement généraliste pourrait offrir 4 avantages majeurs : (i) il permettrait une exploitation simultanée des ressources disponibles dans le milieu, augmentant les quantités de pollen et de nectar récoltées par unité de temps (Williams & Tepedino, 2003) ; (ii) un tel mélange de pollen assurerait une nourriture stable pour les larves en équilibrant les effets des pollens pauvres en protéines ou toxiques ; (iii) ce comportement pourrait figurer une stratégie pour bénéficier de nutriments particuliers (e.g. stérols) d'un pollen défavorable en complétant ses déficiences (e.g. faible teneur en acides aminés) par un bon pollen ; et (iv) le polylectisme pourrait permettre aux abeilles de bénéficier de nutriments particuliers de certains pollens en diluant leurs composés secondaires et donc leur toxicité. Les deux dernières suppositions requièrent de la part du bourdon une aptitude à évaluer la composition chimique du pollen, ce qui semble être le cas (Robertson *et al.*, 1999 ; Leonhards & Blüthgen, 2012). Dans ce contexte, les larves des espèces d'abeilles polylectiques nourries sur les mélanges de pollens bénéficieraient probablement d'un contenu en nutriments d'un pollen particulier sans être affectées négativement par ses propriétés défavorables. De nouveaux tests d'élevage avec des diètes mélangées permettraient de confirmer cette hypothèse.

4.3. Efficacité de la stratégie évolutive des Asteraceae

Bien que des contraintes nutritives, toxiques ou de digestibilité puissent réduire le spectre de visiteurs généralistes ; les Asteraceae restent néanmoins exploitées par ces abeilles polylectiques pour le nectar. En effet, si la récolte de pollen des bourdons est principalement effectuée sur les Fabaceae, ils étendent leur récolte de nectar aux Asteraceae, Boraginaceae, Lamiaceae et Scrophulariaceae (Rasmont & Mersch, 1988 ; Goulson & Darvill, 2004 ; Goulson *et al.*, 2005). D'après l'étude de Goulson *et al.* (2005), les genres *Centaurea* et *Cirsium* constituent les principales ressources de nectar pour les bourdons parmi les Asteraceae, bien qu'il s'agisse d'une famille moins exploitée que les Fabaceae pour la collecte de nectar (i.e. 21,9% des visites à nectar pour les Asteraceae ; 36,8% des visites à nectar pour les Fabaceae), suggérant l'existence de propriétés les rendant moins attractives. Le présence de composés secondaires dans le nectar, phénomène assez répandu, pourrait expliquer cette différence (Adler, 2000 ; Lundgren, 2009). Bien que des effets négatifs sur les pollinisateurs aient été prouvés (e.g. Adler, 2000), les fonctions exactes de leur présence demeurent méconnues.

Cette étude montre clairement l'existence d'une variabilité chimique du pollen aussi grande au sein de la famille des Asteraceae qu'entre espèces appartenant à des familles phylogénétiquement distantes. Cette complexité chimique pourrait être assimilée à une

stratégie de sélection des pollinisateurs, limitant l'exploitation du pollen par les espèces généralistes mais assurant une pollinisation en les attirant par le biais du nectar. Le paradoxe des Asteraceae ne semble pas régi au travers d'une contrainte unique mais la protection du pollen semble être effective par le biais de diverses stratégies en fonction des espèces (i.e. contrainte nutritive, toxique et/ou de digestibilité).

La stratégie des Asteraceae semble extrêmement efficace. D'une part, la chimie des pollens permet de filter les récolteurs de pollen spécialisés, fidèles et efficaces, mais potentiellement rares. D'autre part, la production de nectar attire des pollinisateurs plus généralistes et ubiquistes, mais peu récolteurs de pollen. Cette double stratégie de pollinisation pourrait être un des éléments expliquant le succès évolutif de cette famille qui représente environ 10% de la biodiversité des plantes à fleurs (Anderberg *et al.*, 2007).

5. Conclusion

Les résultats de cette étude confirment la variabilité interspécifique de la composition chimique du pollen (i.e. toxicité et valeur nutritive). Parmi les neuf familles étudiées, les Asteraceae semblent caractérisées par un faible contenu en acides aminés ainsi que par la présence importante de $\delta 7$ -stérols. Bien que quelques espèces présentent des alcaloïdes, ce trait ne peut pas être généralisé à l'ensemble de la famille. Toutes ces caractéristiques chimiques propres aux Asteraceae sont combinées à une variabilité non négligeable des propriétés du pollen.

Parallèlement, les élevages menés confirment l'influence de tels profils chimiques sur le développement des micro-colonies. Ainsi, la quantité de pollen collectée est influencée par la composition chimique de la diète composée exclusivement de pollen d'Asteraceae. Les résultats suggèrent également une compensation partielle via une augmentation de la consommation en sirop. D'un point de vue développemental, les larves produites sont peu nombreuses et plus légères, suggérant une perturbation de la dynamique de la colonie due à la qualité nutritionnelle de la diète.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence la grande complexité des Asteraceae et suggèrent l'existence de plusieurs stratégies au sein de cette famille afin de spécialiser les pollinisateurs et limiter les pertes excessives de pollen. Les causes de l'inadéquation alimentaire du pollen de *Cirsium* s.l. (Asteraceae) pour les micro-colonies de *Bombus terrestris* restent encore hypothétiques. Bien que le contenu nutritif et la présence de composés secondaires semblent influencer le développement des abeilles, nous n'avons pu mettre clairement en évidence une ou plusieurs causes. Cependant, certaines pistes semblent se profiler telles que la faible teneur en acides aminés essentiels, la richesse en $\delta 7$ -stérols, la faible teneur en stérols bénéfiques, la mauvaise digestibilité ainsi que la présence de composés secondaire autres que les alcaloïdes.

6. Perspectives

Bien que de nombreux progrès aient été réalisés ces dernières années concernant la chimie du pollen et les relations plantes-pollinisateurs, plusieurs questions restent sans réponse.

Tout d'abord, il serait intéressant de développer et/ou de mettre au point des méthodes de chimie analytique visant à effectuer des analyses micro-quantitatives de composés secondaires (i.e. saponines et lactones sesquiterpéniques) et des pigments présents au sein du pollen et/ou des tissus d'abeilles (i.e. larves et imagos). Ces outils méthodologiques permettraient de caractériser de manière plus précise le pollen et de pouvoir ainsi améliorer la compréhension des interactions plantes-pollinisateurs.

Le pollen apparaissant comme l'une des ressources les plus protégées (Detzel & Wink, 1993 ; Wink, 2003 ; Wink, 2013), les abeilles sont donc potentiellement confrontées à des métabolites secondaires de la plante auxquelles elles pourraient ne pas être adaptées. Dans ce contexte, il serait intéressant de comparer les aptitudes de différentes espèces d'abeilles à se développer sur une ressource riche en composés secondaires (e.g. pollen d'Asteraceae) ou supplémentée en substances présentant potentiellement un effet négatif (e.g. alcaloïdes). Des tests de choix binaires pourraient également être envisagés afin de mettre en évidence la capacité de détection des abeilles envers une ressource toxique.

De nouveaux élevages de micro-colonies de *Bombus terrestris* sur d'autres diètes à base de pollen d'Asteraceae pourraient permettre de comparer le développement de cette espèce généraliste sur ce type de ressources. Par ailleurs, la réalisation de diètes mixtes permettrait d'évaluer la compensation ou la dilution des propriétés défavorables de certains pollens, comme suggéré par les travaux d'Eckhardt *et al.* (2013).

En outre, l'étude des voies de détoxification de type cytochrome P450 par l'intermédiaire d'analyses quantitatives par PCR pourrait être envisagée de manière à refléter l'effet moins bénéfique d'un pollen sur les abeilles. De même, alors que le contenu protéique du pollen et la diversité de la diète influencent l'immuno-compétence de l'abeille mellifère (Alaux *et al.*, 2010), l'étude du système immunitaire pourrait être envisagée afin de renseigner sur la qualité des ressources.

Enfin, des expérimentations avec des colonies de taille réelle seraient nécessaires pour valider nos observations, en particulier dans un contexte de variation naturelle de la composition de la diète pollinique. En effet, dans un environnement naturel, les bourdons choisissent leurs ressources. Malgré une dominance des plantes de la famille des Asteraceae dans la majorité des écosystèmes, les bourdons pourraient mélanger leurs ressources évitant ainsi les composés nocifs.

7. Bibliographie

- Adler L.S. (2000).** The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, **91**: 409-420.
- Alford D.V. (1975).** Bumblebees. London: Davis-Poynter, 352 pp.
- Alaux C., Boulot M., Jaisson P. & Hefetz A. (2007).** Reproductive plasticity in bumblebees workers (*Bombus terrestris*) – reversion from fertility to sterility under queen influence. *Behaviour Ecology Sociobiology*, **62**: 213-222.
- Alaux C., Ducloz F., Crauser D. & Le Conte Y. (2010).** Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, **6**: 562-565.
- Amaya-Márquez M. (2009).** Floral constancy in bees: a revision of theories and a comparison with other pollinators. *Revista Colombiana de Entomología*, **35(2)**: 206-216.
- Amdam G.V. & Omholt S.W. (2002).** The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, **216(2)**: 202-228.
- Anderberg A.A., Baldwin B.G., Bayer R.G., Breitwieser J., Jeffrey C., Dillon M.O., Eldenäs P., Funk V., Garcia-Jacas N., Hind D.J.N., Karis P.O., Lack H.W., Nesom G., Nordenstam B., Oberprieler C., Panero J.L., Puttock C., Robinson H., Stuessy T.F., Susanna A., Urtubey E., Vogt R., Ward J. & Watson L.E. (2007).** Compositae. In: Kadereit JW, Jeffrey C, eds. *The families and genera of vascular plants. Volume VIII. Flowering plants. Eudicots. Asterales*. Berlin: Springer, 61-588.
- Anke S., Niemüller D., Moll S., Hänsch R. & Ober D. (2004).** Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase. *Plant Physiology*, **136**: 4037-4047.
- Baker H. G. (1977).** Non-sugar chemical constituents of nectar. *Apidologie*, **8**: 349-356.
- Bain J.F. (1991).** The biology of Canadian weeds *Senecio jacobaea* L. *Canadian Journal of Plant Science*, **71**: 127-140.
- Barbier M. (1966).** Le 24-méthylène cholestérol (ergosta 5,24 (28) - diène 3 β - ol). *Annales de l'Abeille*, **9(3)**: 243-249.
- Basualdo M., Barragán S., Vanagas L., García C., Solana H., Rodríguez E. & Bedascarrasbure E. (2013).** Conversion of high and low pollen protein diets into protein in worker honeybees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, **106(4)**: 1553-1558.
- Beekman M., Van Stratum P. & Lingeman R. (1998).** Diapause survival and post-diapause performance in bumblebee queens (*Bombus terrestris*). *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **89**: 207-214.
- Beekman M. & Van Stratum P. (1998).** Bumblebee sex ratios: why do bumblebees produce so many males? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **265**: 1535-1543.

- Behmer S.T., Elias D.O. & Bernays E.A. (1999a).** Post-ingestive feedbacks and associative learning regulate the intake of unsuitable sterols in a generalist grasshopper. *Journal of Experimental Biology*, **202**: 739-748.
- Behmer S.T., Elias D.O. & Grebenok R.J. (1999b).** Phytosterol metabolism and absorption in the generalist grasshopper *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **42**: 13-25.
- Behmer S.T. & Nes W.D. (2003).** Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. *Advances in Insect Physiology*, **31**: 1-72.
- Bischoff I., Feltgen K. & Breckner D. (2003).** Foraging Strategy and Pollen Preferences of *Andrena vaga* (Panzer) and *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, **12(2)**: 220-237.
- Bischoff I., Eckelt E. & Kuhlmann M. (2005).** On the biology of the ivy-bee *Colletes hederæ* Schmidt & Westrich, 1993 (Hymenoptera, Apidae). *Bonner Zoologische Beiträge*, **53**: 27-35.
- Brink D. & De Wet J.M.J. (1980).** Interpopulation variation in nectar production in *Aconitum columbianum* (Ranunculaceae). *Oecologia*, **47**: 160-163.
- Briscoe A.D. & Chittka L. (2001).** The evolution of color visions in insects. *Annual Review of Entomology*, **46**: 471-510.
- Boppré M., Colegate S.M., Edgar J.A. & Fischer O.F. (2008).** Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in pollen and drying-related implications for commercial processing of bee pollen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**: 5662-5672.
- Bouayad N., Rharrabe K., Lamhamdi M., Nourouti N.G. & Sayah F. (2012).** Dietary effects of harmine, a β -carboline alkaloid, on development, energy reserves and α -amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Saudi Journal of Biological Sciences*, **19**: 73-80.
- Buchmann S.L. & Nabhan G.P. (1996).** The forgotten pollinators. Island Press, Washington, DC. 292 pp.
- Burke J.M., Gardner K.A. & Rieseberg L.H. (2002).** The potential for gene flow between cultivated and wild sunflower (*Helianthus annuus*) in the United States. *American Journal of Botany*, **89(9)**: 1550-1552.
- Calabria L.M., Piacente S., Kapusta I., Dharmawardhane S.F., Segarra F.M., Pessiki P.J. & Mabry T.J. (2008).** Triterpene saponins from *Silphium radula*. *Phytochemistry*, **69**: 961-972.
- Cane J.H. & Sipes S.D. (2006).** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty, in: Waser N.M. & Ollerton J. (Eds.), *Plant-pollinator interactions from specialization to generalization*. The University of Chicago Press, Chicago, 99-122 pp.
- Cardinal S., & Danforth B.N. (2013).** Bees diversified in the age of eudicots. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280(1755)**: 1-9.

- Carisey N. & Bauce E. (1997).** Impact of balsam fir flowering on pollen and foliage biochemistry in relation to spruce budworm growth, development and food utilization. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **85**: 17-31.
- Castillo M., Martínez-Pardo R., Garcerá M. D. & Couillaud F. (1998).** Biological activities of natural sesquiterpene lactones and the effect of synthetic sesquiterpene derivatives on insect juvenile hormone biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**: 2030-2035.
- Clark A.J. & Bloch K. (1959).** Function of sterols in *Dermetes vulpinus*. *Journal of Biological Chemistry*, **234**: 2583-2588.
- Clayton R. B. (1964).** The utilization of sterols by insects. *Journal of Lipid Research*, **5**: 3-19.
- Cnaani J. & Hefetz A. (1994).** The effect of workers size frequency-distribution on colony development in *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, **41**: 301-307.
- Cook S. M., Awmack C. S., Murray D.A. & Williams I.H. (2003).** Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology*, **28(5)**: 622-627.
- Cordeiro M.L. & Djerassi C. (1990).** Biosynthetic-studies of marine lipids. 25. Biosynthesis of delta-9(11)-sterols and delta-7-sterols and saponins in sea-cucumbers. *Journal of Organic Chemistry*, **55(9)**: 2806-2813.
- Coste H., 1937.** Flore descriptive et illustrée de la France de la Corse et des contrées limitrophes. Librairie des Sciences et des Arts, Paris. 627 pp.
- Couvillon M.J. & Dornhaus A. (2010).** Small worker bumble bees (*Bombus impatiens*) are hardier against starvation than their larger sisters. *Insectes Sociaux*, **57**: 193-197.
- Crailsheim K., Schneider LHW., Hrassnigg N., Bühlmann G., Brosch U., Gmeinbauer R. & Schöffmann R. (1992).** Pollen consumption and utilization in worker honeybees (*Apis mellifera carnica*): Dependence on individual age and function. *Journal of Insect Physiology*, **38(6)**: 409-419.
- Crane E. (1977).** Dead bees under lime trees, Sugars poisonous to bees. *Bee World*, **58**: 129-130.
- Crane E. (1978).** Sugars poisonous to bees. *Bee World*, **59**: 37-38.
- Cresswell J. E. & Galen C. (1991).** Frequency dependent selection and adaptive surfaces for floral trait combinations: the pollination of *Polemonium viscosum*. *American Naturalist*, **138**: 1342-1353.
- Cresswell J.E., Page C.J., Uygun M.B., Holmbergh M., Li Y., Wheeler J.G., Laycock I., Pook C.J., de Ibarra N.H., Smirnoff N. & Tyler C.R. (2012).** Differential sensitivity of honeybees and bumble bees to a dietary insecticide (imidacloprid). *Zoology*, **115(6)**: 365-371.

- Danforth B., Sipes S., Fang J. & Brady S.G. (2006).** The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **103(41)**: 15118-15123.
- Danforth B., Eardley C., Packer L., Walker K., Pauly A. & Randrianambinintsoa F.J. (2008).** Phylogeny of Halictidae with an emphasis on endemic African Halictinae. *Apidologie*, **39(1)**: 86-101.
- Danforth B.N., Cardinal S., Praz C., Almeida E. A.B. & Michez D. (2013).** The impact of Molecular data on our understanding of bee phylogeny and evolution. *Annual Review of Entomology*, **58**: 57-78.
- Day S., Beyer R., Mercer A. & Ogden S. (1990).** The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago, New Zealand. *Journal of Apicultural Research*, **29**: 138-146.
- De Groot A.P. (1953).** Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera*). *Physiologia Comparata et d'Ecologia*, **3**: 197-285.
- de Melo I.R.B.V., da Costa Lages M.C., dos Santos D.P., Maracaja P.B., de Rodrigues R.A.P.F. & Soto-Blanco B. (2013).** The pollen of *Caesalpinia pyramidalis* Tul. is toxic to honeybees (*Apis mellifera*). *Arthropod-Plant Interactions*, **7(4)**: 463-466.
- De Luca P.A., Bussière L.F., Souto-Vilaros D., Goulson D., Mason A.C. & Vallejo-Marín M. (2013).** Variability in bumblebee pollination buzzes affects the quantity of pollen released from flowers. *Oecologia*, **172**: 805-816.
- Detzel A. & Wink M. (1993).** Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology*, **4**: 8-18.
- Dimande A.F.P., Botha C.J., Prozesky L., Bekker L., Rosemann G.M., Labuschagne L. & Retief E. (2007).** The toxicity of *Senecio inaequidens* DC. *Journal of the South African Veterinary Association*, **78(3)**: 121-129.
- Djegham Y., Verhaeghe J.C. & Rasmont P. (1994).** Copulation of *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae) in captivity. *Journal of Apicultural Research*, **33**: 15-20.
- Duffield G.E., Gibson R.C., Gilhooly P.M., Hesse A.J., Inkley C.R., Gilbert F.S. & Barnard C.J. (1993).** Choice of flowers by foraging honeybees (*Apis mellifera*) - possible morphological cues. *Ecological Entomology*, **18**: 191-197.
- Dötterl S., Füssel U., Jürgens A. & Aas G. (2005).** 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology*, **31**: 2993-2998.
- Dötterl S. & Vereecken N. (2010).** The chemical ecology and evolution of bee-flower interactions: a review and perspectives. *Canadian Journal of Zoology*, **88**: 668-697.
- Eckhardt M., Haider M., Dorn S. & Müller A. (2013).** Pollen mixing in pollen generalist solitary bees : a possible strategy to complement or mitigate unfavourable pollen properties? *Journal of Animal Ecology*, **83(3)**: 588-597.

- Eckhart V. M. (1991).** The effects of floral display on pollinator visitation vary among populations of *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolutionary Ecology*, **5**: 370-384.
- Eickwort G.C. (1970).** *Hoplitis anthocopoides*, a european mason bee established in New York State (Hymenoptera: Megachilidae). *Psyche*, **77**:190-201.
- Engel M. S. (2005).** Family-group names for bees (Hymenoptera: Apoidea). *American Museum Novitates*, **3476**: 1-33.
- Engel M. S. (2011).** Systematic melittology: where to from here? *Systematic Entomology*, **36**: 2-15.
- Ernst W.H.O. (1998).** Invasion, dispersal and ecology of the South African neophyte *Senecio inaequidens* in The Netherlands: from wool alien to railway and road alien. - *Acta Botanica Neerlandica*, **47**: 131-151.
- Fægri K. & van der Pijl L. (1979).** The principles of pollination ecology, 3rd edition. Pergamon Press.
- Feldlaufer M.F., Herbert Jr[†]E.W., Svoboda J.A., Thompson M.J. & Lusby W.R. (1985).** Makisterone A: The major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, **15(5)**: 597-600.
- Feldlaufer M.F., Svoboda J.A. & Herbert E.W. (1986a).** Makisterone A and 24-Methylenecholesterol from the ovaries of the honeybee, *Apis mellifera*. *Experientia*, **42**: 200-201.
- Feldlaufer M.F., Herbert E.W., Svoboda J.A. & Thompson M.J. (1986b).** Biosynthesis of makisterone A and 20-hydroxyecdysone from labeled sterols by the honey bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **3**: 415-421.
- Fernandes-Da-Silva P. G. & J. E. Serrão (2000).** Nutritive value and apparent digestibility of bee- collected and bee- stored pollen in the stingless bee, *Scaptotrigona postica* Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Apidologie*, **31(1)**: 39-45.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H.P.S. & Becker K. (2002).** The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, **88(6)**: 587-605.
- Free J.B. & Butler C.G. (1959).** Bumblebees, Collins. London. Gardner.
- Funk V.A., Susanna A., Stuessy T.F. and Robinson H. (2009).** Classification of Compositae. In Systematics, evolution, and biogeography of Compositae. Vienna: International Association for Plant Taxonomy.
- Galen C. & Newport M.E.A. (1987).** Bumblebee behaviour and selection on flower size in the sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Oecologia*, **74**: 20-23.
- Galen C. (1989).** Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution*, **43**: 882-890.

- Génissel A., Aupinel P., Bressac C., Tasei J-N. & Chevrier C. (2002).** Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **104**: 329-336.
- Grime J.P., Hodgson J.G. & Hunt R. (1988).** Comparative plant ecology. Unwin Hyman, London, UK.
- Goad L. J., Rubinstein I. & Smith A. G. (1972).** The sterols of Echinoderms. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, **180**: 223-246.
- Gomez J.M., Bosch J., Perfectti F., Fernandez J.D., Abdelaziz M. & Camacho J.P.M. (2008).** Spatial variation in selection on corolla shape in a generalist plant is promoted by the preference patterns of its local pollinators. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **275**: 2241-2249.
- Goslee S.C. & Urban D.L. (2007).** The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, **22(7)**: 1-19.
- Gosselin M., Michez D., Vanderplanck M., Roelants D., Glauser G. & Rasmont P. (2013).** Does *Aconitum septentrionale* chemically protect floral rewards to the advantage of specialist bumblebees? *Ecological Entomology*, **38**: 400-407.
- Goulson D. (2010).** Bumblebees: Behaviour, ecology, and conservation. Oxford University Press, Oxford, UK. 336 pp.
- Goulson D. & Darvill B. (2004).** Niche overlap and diet breadth in bumblebees; are rare species more specialized in their choice of flowers? *Apidologie*, **35**: 55-64.
- Goulson D. & Hanley M.E. (2004).** Distribution and forage use of exotic bumblebees in South Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Ecology*, **28**: 225-232.
- Goulson D., M.E. Hanley, B. Darvill, J.S. Ellis & M.E. Knight (2005).** Causes of rarity in bumblebees. *Biological Conservation*, **122**: 1-8.
- Goulson D., Peat J., Stout J.C., Tucker J., Darvill B., Derwent L.C. & Hughes W.O.H. (2002).** Can alloethism in workers of the bumblebee, *Bombus terrestris*, be explained in terms of foraging efficiency? *Animiaml Behaviour*, **64**: 123-130.
- Grieneisen M.L., Warren J.T. & Gilbert L.I. (1993).** Early steps in ecdysteroid biosynthesis: Evidence for the involvement of cytochrome P450 enzymes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **23**: 13-23.
- Gumbert A. (2000).** Color choices by bumble bees (*Bombus terrestris*): innate preferences and generalization after learning. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **48**: 36-43.
- Guzmán B. & Vargas P. (2005).** Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**: 644-660.
- Hanley M., Franco M., Pichon S., Darvill B. & Goulson D. (2008).** Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology*, **22**: 592-598.

- Harper J.L. & Wood W.A. (1957).** Biological flora of the British Isles. *Senecio jacobaea*. *Journal of Ecology*, **45**: 617-637.
- Harder L.D. & S.C.H. Barrett (1993).** Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata* : effects of anthers position and pollinator specialization. *Ecology*, **74(4)**: 1059-1072.
- Hartmann T. & Ober D. (2000).** Biosynthesis and metabolism of pyrrolizidine alkaloids in plants and specialized insect herbivores. F.J. Leeper, J.C. Vederas (Eds.). Topics in Current Chemistry, vol. 209 Springer, Berlin, pp. 207-244.
- Hartmann T. & Ober D. (2008).** Defense by pyrrolizidine alkaloids: developed by plants and recruited by insects. In: Induced plant resistance to herbivory. Schaller A. (Ed.). Springer Netherlands, 213-231 pp.
- Heger T. & Böhmer H.J. (2005).** The invasion of Central Europe by *Senecio inaequidens* DC. - a complex biogeographical problem. *Erdkunde*, **59**: 34-49.
- Heil M. (2011).** Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science*, **16**: 191-199.
- Heinrich M., Robles M., West J.A., Ortiz de Montellano B.R. & Rodriguez E. (1998).** Ethnopharmacology of mexican asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **38**: 539-65.
- Heiser C.B., Smith D.M., Clevenger B. & Martin W.C. (1969).** The North American sunflower (sunflower). *Memoirs of the Torrey Botinacal Club*, **22**: 1-218.
- Hol W.H.G. & Van Veen J.A. (2002).** Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea* affect fungal growth. *Journal of Chemical Ecology*, **28**: 1763-1772.
- Human H., Nicolson S.W., Strauss K., Pirk C.W.W. & Dietemann V. (2007).** Influence of pollen quality on ovarian development in honeybee workers (*Apis mellifera scutellata*). *Journal of Insect Physiology*, **53**: 649-655.
- Isman M.B. (1985).** Toxicity and tolerance of sesquiterpene lactones in the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes* (Acrididae). *Pesticide biochemistry and physiology*, **24**: 348-354.
- Jacquemart A., Vanparys V. & Meerts P. (2013).** Generalist versus specialist herbivores on the invasive *Senecio inaequidens* and a native related species: what makes the difference? *American Journal of Plant Sciences*, **4(2A)**: 386-394.
- Jakobs G., Weber E. & Edwards P.J. (2004).** Introduced plants of the invasive *Solidago gigantea* (Asteraceae) are larger and grow denser than conspecifics in the native range. *Diversity and Distributions*, **10**: 11-19.
- Jenkins K.J. & Atwal A.S. (1994).** Effects of dietary saponins on fecal bile acids and neutral sterols, and availability of vitamins A and E in the chick. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **5**: 134-137.

- Johnson R.M., Mao W., Pollock H.S., Niu G., Schuler M.A. & Berenbaum M.R. (2012).** Ecologically appropriate xenobiotics induce cytochrome P450s in *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, **7(2)**: e3105.
- Jordon-Thaden I.E. & Louda S.V. (2003).** Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochemical Systematics and Ecology*, **31(12)**: 1353-1396.
- Keller I., Fluri P. & Imdorf A. (2004).** Le pollen et le développement des colonies chez l'abeille mellifera-1^{ère} partie. *Bee world*, **86(1)**: 3-10.
- Kempf M., Heil S., Halauer I., Schmidt L. von der Ohe K., Theuring C., Reinhard A. Schreier P. & Beuerle T. (2010).** Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition and Food Research*, **54**: 292-300.
- Kenta T., Inari N., Nagamitsu T., Goka K. & Hiura T. (2007).** Commercialized European bumblebee can cause pollination disturbance: an experiment on seven native plant species in Japan. *Biological Conservation*, **134**: 298-309.
- Kevan P.G. & Baker H.G. (1983).** Insects as flower visitors and pollinators. *Annual Review of Entomology*, **28**: 407-53.
- Kleijn D. (2003).** Can establishment characteristics explain the poor colonization success of late successional grassland species on ex-arable land? *Restoration Ecology*, **11(2)**: 131-138.
- Kleijn D. & Raemakers I. (2008).** A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology*, **89**: 1811-1823.
- Kicha A.A., Ivanchina N.V., Gorshkova I.A., Ponomarenko L.P., Likhatskaya G.N. & Stonik V.A. (2001).** The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria (Asterina) pectinifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **128**: 43-52.
- Kindt R. & Coe R. (2005).** *Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies*. World Agroforestry Centre (ICRAF), Nairobi. ISBN 92-9059-179-X.
- Kitaoka T.K. & Nieh J.C. (2009).** Bumble bee pollen foraging regulation: role of pollen quality, storage levels, and odor. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **63**: 501-510.
- Lambion J., Delvosalle L. & Duvigneaud J. (2004).** *Nouvelle Flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du Nord de la France et des Régions voisines (Ptéridophytes et Spermatophytes) cinquième édition*. Edition du jardin botanique de Belgique. 1092 pp.
- Landau I., Muller-Scharer H. & Ward P.I. (1994).** Influence of cnicin, a sesquiterpene lactone of *Centaurea maculosa* (Asteraceae), on specialist and generalist insect herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, **20(4)**: 929-942.

- LeCain R. & Shelley R. (2006).** MontGuide: Common tansy (*Tanacetum vulgare*). MT 199911 AG. Bozeman, MT: Montana State University Extension. 3 p. Available online: <http://msuextension.org/publications/AgandNaturalResources/MT199911AG.pdf> [2009, August 14].
- Leonhardt S.D. & Blüthgen N. (2012).** The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie*, **43**: 449-464.
- Lognay G., Dreze P., Wagstaffe P.J., Marlier M., & Severin M. (1989).** Validation of a quantitative procedure for the extraction of sterols from edible oils using radiolabelled compounds. *The Analyst*, **114**: 1287-1291.
- Lognay G., Boenke A., Wagstaffe P.J., Marlier M. & Severin M. (1992).** Edible fats and oils reference materials for sterol analysis with particular attention to cholesterol. Part I. Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. *The Analyst*, **117(7)**: 1093-1097.
- López-García M. D. & Maillet J. (2005).** Biological characteristics of an invasive south African species. *Biological Invasions*, **7**: 181-194.
- Louveaux J. (1959).** Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles. *Les Annales de l'abeille*, **2**: 7-111.
- Lundgren J.G. (2009).** Relationships of natural enemies and non-prey foods. Dordrecht, The Netherlands: Springer International. 454 pp.
- Lüttge U. & Schnepf E. (1976).** Organic substances. In: Lüttge U. & Pitman M. G. (eds), Transport in plants II. B: tissues and organs. Springer-Verlag, 244-277 pp.
- Lüttge U. (1977).** Nectar composition and membrane transport of sugars and amino acids: a review on the present state of nectar research. *Apidologie*, **8**: 305-319.
- Macel M., Klinkhamer P.G.L., Vrieling K. & Van der Meijden E. (2002).** Diversity of pyrrolizidine alkaloids in Senecio species does not affect the specialist herbivore *Tyria jacobaea*. *Oecologia*, **133**: 541-550.
- Manson J. S. & Thomson J.D. (2009).** Post-ingestive effects of nectar alkaloids depend on dominance status of bumble bees. *Ecological Entomology*, **34**: 421-426.
- Manson S.J., Otterstatter M.C. & Thomson J.D. (2010).** Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia*, **162**: 81-89.
- Mattila H.R. & Otis G.W. (2006).** Influence of pollen diet in spring on development of honey bee (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, **99(3)**: 604-613.
- Mao W., Schuler M.A. & Berenbaum M.R. (2011).** CYP9Q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**: 12657-12662.
- Michener C.D. (2007).** The Bees of the World. Baltimore MD: Johns Hopkins Univ. Press. 913 pp.

- Michez D. (2007).** La nouvelle classification des abeilles (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes) ou la chute de l'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) de son piédestal. *Osmia*, **1**: 23-26.
- Michez D., Patiny S., Rasmont P., Timmermann K. & Vereecken N.J. (2008a).** Phylogeny and hostplant evolution in Melittidae *s.l.* (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie*, **39**:146-162.
- Michez D., Joris I. & Iserbyt S. (2008b).** Eco-éthologie des visiteurs de *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) en Belgique. *Belgian Journal of Entomology*, **10**: 37-55.
- Milgate J. & Roberts D.C.K. (1995).** The nutritional & biological significance of saponins. *Nutrition Research*, **15(8)**: 1223-1249.
- Minckley R.L. & Roulston T.H. (2006).** Incidental mutualisms and pollen specialization among bees. In: Waser NM, Ollerton J, eds. *Plant-pollinator interactions from specialization to generalization*. Chicago, IL: University of Chicago Press, 69-98.
- Mithöfer A. & Boland W. (2012).** Plant defence against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, **63**: 431-450.
- Moerman R. (2011).** Impact de la diversité des ressources alimentaires sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). Mémoire de fin d'études, Université de Mons, 88 pp.
- Müller A. (1996).** Host-plant specialization in western palearctic anthidiine bees (Hymenoptera: Apoidea: Megachilidae). *Ecological Monographs*, **66**: 235-257.
- Müller A. & Bansac N. (2004).** A specialized pollen-harvesting device in western palaeartic bees of the genus *Megachile* (Hymenoptera, Apoidea, Megachilidae). *Apidologie*, **35**: 329-337.
- Müller A., Diener S., Schnyder S., Stutz K., Sedivy C. & Dorn S. (2006).** Quantitative pollen requirements of solitary bees: Implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological conservation*, **130**: 604-615.
- Müller A. & Kuhlmann M. (2008).** Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society*, **95**: 719-733.
- Murdoch D. & Chow E.D. (2012).** ellipse: Functions for drawing ellipses and ellipse-like confidence regions. R package version 0.3-7.
- Nagamitsu T., Kenta T., Inari N., Goka K. & Hiura T. (2007).** Foraging interactions between native and exotic bumblebees: Enclosure experiments using native flowering plants, *Journal of Insect Conservation*, **11**: 123-130.
- Nagamitsu T., Yamagishi H., Kenta T., Inari N. & Kato E. (2009).** Competitive effects of the exotic *Bombus terrestris* on native bumble bees revealed by a field removal experiment. *Population Ecology*, **52**: 123-136.

- Nicolson S.W. & Thornburg R. (2007).** Nectar chemistry. In: Nectaries and Nectar (eds. S. W. Nicolson, E. Pacini & M. Nepi). *Springer*: 215-263.
- Nicolson S.W. (2011).** Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, **46(2)**: 197-204.
- Nicolson S.W. & Human H. (2013).** Chemical composition of the ‘low quality’ pollen of sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Apidologie*, **44**: 144-152
- Oakenfull D. (1981).** Saponins in food - a review. *Food Chemistry*, **6**: 19-40.
- Ohara M. & Higashi S. (1994).** Effects of inflorescence size on visits from pollinators and seed set of *Corydalis ambigua* (Papaveraceae). *Oecologia*, **98**: 25-30.
- Ollerton J., Winfree R. & Tarrant S. (2011).** How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, **120**: 321-326.
- Oksanen J., Blanchet F.G., Kindt R., Legendre P., Minchin P.R., O’Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Henry M., Stevens H. & Wagner H. (2012).** vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-5.
- Opitz S.E.W. & Müller C. (2009).** Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology*, **19**: 117-154.
- Ortiz S., Bonifacino J.M., Crisci J.V., Funk V.A., Hansen H.V., Hind D.J.N., Katinas L., Roque N., Sancho G., Susanna A. & Tellería M.C. (2009).** The basal grade of Compositae: Mutisieae (*sensu Cabrera*) and Carduoideae. 193-213. In: Funk V.A., Susanna A., Stuessy T.F. & Bayer R.J., eds. *Systematics, evolution, and biogeography of Compositae*. International Association for Plant Taxonomy. 965 pp.
- Osborn A. (1996).** Saponins and plant defence – a soap story. *Trends in Plant Science*, **1(1)**: 4-9.
- Peat J., Tucker J. & Goulson D. (2005).** Does intraspecific size variation in bumblebees allow colonies to efficiently exploit different flowers? *Ecological Entomology*, **30**: 176-181.
- Pelser P.B., Gravendeel B. & Van der Meijden R. (2002).** Tackling speciose genera: species composition and phylogenetic position of *Senecio* sect. *Jacobaea* (Asteraceae) based on plastid and nrDNA sequences. *American Journal of Botany*, **89**: 929-939.
- Peng Y. S., Nasr M. E., Marston J. M. & Yuenzhen F. (1985).** The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees. *Physiological Entomology*, **10**: 75-82.
- Pereboom J.J.M. (2000).** The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insectes Sociaux*, **47(1)**: 11-20.
- Pernal S.F. & Currie R.W. (2002).** Discrimination and preferences for pollen-based cues by foraging honeybees, *Apis mellifera* L. *Animal Behaviour*, **63(2)**: 369-390.
- Ponchau O., Iserbyt S., Verhaeghe J-C. & Rasmont P. (2006).** Is the caste ratio of the oligolectic bumblebee *Bombus gerstaeckeri* MORAWITZ (Hymenoptera: Apidae) biased to queens? *Annales de la Société entomologique de France* (n.s.), **42**: 207-214.

- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. & Kuhn W.E. (2010).** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, **25**: 345-353.
- Pouvreau A. (2004).** Les insectes pollinisateurs. Delachaux et Niestlé. 191 pp.
- Praz C.J., Müller A. & Dorn S. (2008).** Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen? *Ecology*, **89**: 795-804.
- Prys-Jones O. E. & Corbet S. A. (1991).** Bumblebees. Cambridge University Press. 86 pp.
- Rasmont P. & Mersch P. (1988).** Première estimation de la dérive faunique chez les bourdons de la Belgique (Hymenoptera : Apidae). *Annales de la Société royale zoologique de Belgique*, **118**: 141-147.
- Rasmont P., Regali A., Ings T.C., Lognay G., Baudart E., Marlier M., Delcarte E., Viville P., Marot C., Falmagne P., Verhaeghe J.-C. & Chittka L. (2005).** Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera, Apidae). *Journal of Economic Entomology*, **98(3)**: 656-663.
- Rasmont P., Coppée A., Michez D. & De Meulemeester T. (2008).** An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, **44**: 243-250.
- Regali A. (1995).** Contribution à l'étude des besoins alimentaires de *Bombus terrestris* (L.). Thèse de doctorat, Université de Mons-Hainaut, Mons, 144 + 29 pp.
- Regali A. (1996).** Contribution à l'étude des besoins alimentaires en stéroïdes de *Bombus terrestris* (L.). Thèse de doctorat. Université de Mons-Hainaut, Belgique, 143pp.
- Regali A. & Rasmont P. (1995).** Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez les colonies orphelines de *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, **26**: 273-281.
- Řehoř I., Macháčková L., Bučánková A., Matějková S., Černá K. & Straka J. (2014).** Measuring the sugar consumption of larvae in bumblebee micro-colonies: A promising new method for tracking food economics in bees. *Apidologie*, **45(1)**: 116-128.
- Reinhard A., Janke M., von der Ohe W., Kempf M., Theuring C., Hartmann T., Schreier P. & Beuerle T. (2009).** Feeding deterrence and detrimental effects of pyrrolizidine alkaloids fed to honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Chemical Ecology*, **35**: 1086-1095.
- Ribeiro M.F., Duchateau M.J. & Velthuis H.H.W. (1996).** Comparaison of the effects of two kinds of commercially available pollen on colony development and queen production in the bumble bee *Bombus terrestris*. *Apidologie*, **27**: 133-144.
- Roberts D.W. (2012).** labdsv: Ordination and Multivariate Analysis for Ecology. R package version 1.5-0.

- Robertson A.W., Mountjoy C., Faulkner B., Roberts M. & Macnair M. (1999).** Bumblebee selection of *Mimulus guttatus* flowers: The effects of pollen quality and reward depletion. *Ecology*, **80**: 2594-2606.
- Roelandts A. (2010).** Protocole de test alimentaire de pollen pour l'élevage industriel de *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). Mémoire de fin d'études, Université de Mons, 110 pp.
- Röseler P.F. (1985).** A technique for year-round rearing of *Bombus terrestris* (Apidae, *Bombini*) colonies in captivity. *Apidologie*, **16(2)**: 165-170.
- Roulston T.H. & Cane J.H. (2000).** Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, **222**: 187-209.
- Roulston T. H. & Cane J. H. (2002).** The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evolutionary Ecology*, **16**: 49-65.
- Roulston T.H., Cane J.H. & Buchmann S.L. (2000).** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interaction, or phylogeny? *Ecological Monographs*, **70**: 617-643.
- Sadasivam S. & Thayumanavan B.B. (2003).** Molecular host plant resistance to pests. New York, 479 pp.
- Sans F.X., Escarré J., Gorse V. & Lepart J. (1998).** Persistence of *Picris hieracioides* populations in old fields. An example of facilitation. *Oikos*, **83**: 283-292.
- Sans F.X., Garcia-Serrano H. & Afán I. (2004).** Life-history traits of alien and native *Senecio* species in the Mediterranean region. *Acta Oecologica*, **26**: 167-178.
- Schaffner U., Vrieling K. & Van der Meijden E. (2003).** Pyrrolizidine alkaloid content in *Senecio*: ontogeny and developmental constraints. *Chemoecology*, **13**: 39-46.
- Schlindwein C., Wittmann D., Martins C.F., Hamm A., Siqueria J.A. & Schiffer D. (2005).** Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and intro reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution*, **250**: 147-156.
- Sedivy C., Müller A. & Dorn S. (2011).** Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*, **25**: 718-725.
- Sedivy C., Piskorski R., Müller A. & Dorn S. (2012).** Too low to kill: Concentration of the secondary metabolite ranunculin in buttercup pollen does not affect bee larval survival. *Journal of Chemical Ecology*, **38(8)**: 996-1002.
- Sharkey M. (2007).** Phylogeny and classification of Hymenoptera. *Zootaxa*, **1668**: 521-548.
- Shi J., Arunasalam K., Yeung D., Kakuda Y., Mittal G. & Jiang Y. (2004).** Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits. Review. *Journal of Medicinal Food*, **7(1)**: 67-78.

- Shykoff J.A., Bucheli E. & Kaltz O. (1997).** Anther smut disease in *Dianthus silvester* (Caryophyllaceae): natural selection on floral traits. *Evolution*, **51**: 383-392.
- Simal J., Huidobro J.F. & Muniategui S. (1988).** Estudio de la fraccion esterolica de polen apicola. *Grasas Aceites*, **39(6)**: 327-333.
- Sipes D. & Tepedino V.J. (2005).** Pollen-host specificity and evolutionary patterns of host switching in a clade of specialist bees (Apoidea: *Diadasia*). *Biological Journal of the Linnean Society*, **86**: 487-505.
- Smith L. & Culvenor C. (1981).** Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Natural Products*, **44**: 129-151.
- Somerville D.C. & Nicol H.I. (2006).** Crude protein and amino acid composition of honey bee-collected pollen pellets from south-east Australia and a note on laboratory disparity. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **46**: 141-149.
- Somme L., Vanderplanck M., Michez D., Lombaerde I., Moerman R., Wathelet B., Lognay G. & Jacquemart A.-L. (2014).** Pollen and nectar quality drive major and minor floral choices of bumble bees. *Apidologie*, submitted.
- Soons M.B. & Heil G.B. (2002).** Reduced colonization capacity in fragmented populations of wind-dispersed grassland forbs. *Journal of Ecology*, **90**: 1033-1043.
- Spaethe J. & Weidenmuller A. (2002).** Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insect Societaux*, **49**: 142-146.
- Standifer L.N., McCaughey W.F., Dixon S.E., Gilliam M. & Loper G.M. (1980).** Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, Amino acids and enzymes. *Apidologie*, **11**: 163-171.
- Stanton M.L. & Preston R. (1988).** A qualitative model for evaluating the effects of flower attractiveness on male and female fitness in plants. *American Journal of Botany*, **75**: 540-544.
- Stevens PF. (2012).** *Angiosperm phylogeny website*. Available at <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb>. Version 12, July 2012. Retrieved 26 February 2014.
- Suárez-Cervera M., Marquez J., Bosch J. & Seoane-Camba J. (1994).** An ultrastructural study of pollen grains consumed by larvae of *Osmia* bees (Hymenoptera, Megachilidae). *Grana*, **33**: 191-204.
- Svoboda J.A., Thompson M.J., Robbins W.E. & Kaplanis J.N. (1978).** Insect Steroid Metabolism. *Lipids*, **13(10)**: 742-753.
- Svoboda J.A., Herbert E.W., Lusby W.R. & Thompson M.J. (1983).** Comparaison of sterols of pollens, honeybee workers, and prepupae from field sites. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **1**: 25-31.
- Talavera S., Gibbs P. E. & Herrera J. (1993).** Reproductive biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Systematic and Evolution*, **186**: 123-134.

- Tasei J-N. (1984).** Biologie et écologie des Mellifères sauvages solitaires. In P. Pesson & J. Pouvreau, *Pollinisation et productions végétales*, 577-593 pp., INRA., Paris.
- Tasei J-N. & Aupinel P. (2008a).** Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera : Apidae). *Apidologie*, **39**: 397-409.
- Tasei J-N. & Aupinel P. (2008b).** Validation of a method using queenless *bombus terrestris* micro-colonies for testing the nutritive value of commercial pollen mixes by comparison with queenright colonies. *Journal of Economic Entomology*, **101(6)**: 1737-1742.
- Teuber L.R. & Barnes D.K. (1979).** Breeding alfalfa for increased nectar production. Proceedings of the IVth International Symposium on Pollination, *Maryland Agricultural Experimental Station Special Miscellaneous Publications*, **1**: 109-116.
- Theis N. (2006).** Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. *Journal of Chemical Ecology*, **32**: 917-927.
- Thomson J. (2003).** When is it mutualism? *The American Naturalist*, **162**: S1-S9.
- Thorp RW. (1979).** Structural behavioral, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **66(4)**: 788-812.
- Thorp R.W. (2000).** The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution*, **222**: 211-223.
- Timmermann K. & Kuhlmann M. (2008).** The biology of a *Patellapis* (s. str.) species (Hymenoptera: Apoidea: Halictidae): sociality described for the first time in this bee genus. *Apidologie*, **39**: 187-197.
- Vanderplanck M., Michez D., Vancraenenbroeck S. & Lognay G. (2011).** Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical letters*, **44**: 1807-1820.
- Vanderplanck M. (2013).** How does physiology interface with ecology? Dietetic constraint in host-plant choices of bees. Thèse de doctorat. Université de Mons. 389 pp.
- Vanderplanck M., Wattiez R., Leroy B. & Michez D. (2014a).** Standardised protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, **45(2)**: 192-204.
- Vanderplanck M., Moerman R., Rasmont P., Lognay G., Wathelet B., Wattiez R. & Michez D. (2014b).** How does pollen chemistry impact development and feeding behaviour of polylectic bees? PLoS ONE, **9(1)**: e86209.
- Vanparys V., Meerts P. & Jacquemart A-L. (2008).** Plant-pollinator interactions: comparison between an invasive and a native congeneric species. *Acta Oecologica*, **34**: 361-369.
- Velthuis H.H.W. & van Doorn A. (2006).** A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie*, **37**: 421-451.

- Waller G. R. & Yamasaki K. (1996).** Saponins used in food and agriculture. New York, Plenum Press. 432 pp.
- Weiner C. N., Hilpert A., Werner M., Linsenmair K. E. & Bluthgen N. (2010).** Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, **41(4)**: 476-487.
- Weissenberg M., Levy A., Svoboda J.A. & Ishaaya I. (1998).** The effect of some solanum steroidal alkaloids and glycoalkaloids on larvae of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Phytochemistry*, **47(2)**: 203-209.
- Westerkamp C. (1996).** Pollen in bee–flower relations. Some considerations on melittophily. *Botanica Acta*, **109**: 325-332.
- Williams N.M. (2003).** Use of novel pollen species by specialist and generalist solitary bees (Hymenoptera: Megachilidae). *Oecologia*, **134**: 228-237.
- Williams N.M. & Tepedino V.J. (2003).** Consistent mixing of nectar and distant resources in foraging bouts by the solitary mason bee *Osmia lignaria*. *Behavioral Ecology*, **14**: 141-149.
- Wink M., Schmeller T. & Latz-Brüning B. (1998).** Modes of action of allelochemical alkaloids: interaction with neuroreceptors, dna, and other molecular targets. *Journal of chemical ecology*, **24(11)**: 1881-1937.
- Wink M. (2003).** Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, **64**: 3-19.
- Wink M. (2013).** Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany*, **89**: 164-175.
- Xie G., Schepetkin I.A. & Quinn M.T. (2009).** Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. *International Immunopharmacology*, **7**: 1639-1650.
- Xue J., Stange J.P., Welker D.L. & James R.R. (2013).** Detoxification and stress response genes expressed in a western North America bumble bee, *Bombus huntii* (Hymenoptera: Apidae). *BMC Genomics*, **14**: 874.

8. Annexes

Annexe 1. Composition en acides aminés des pollens floraux. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de la composition totale en acides aminés. Les acides aminés essentiels sont en gras. N.D. : non détecté.

Acide aminé	Famille	Araliaceae	Asteraceae							
	Espèce	<i>Hedera helix</i>	<i>Aster tripolium</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Hypochaeris radicata</i>	<i>Picris hieracioides</i>	<i>Senecio inaequidens</i>	<i>Senecio jacobaea</i>	<i>Solidago gigantea</i>	<i>Tanacetum vulgare</i>
Asparagine		9,77 ± 0,31	9,77 ± 0,04	2,37 ± 0,12	8,13 ± 0,14	8,51 ± 0,13	9,33 ± 0,14	9,29 ± 0,56	10,10 ± 0,41	9,66 ± 0,03
Thréonine		4,58 ± 0,02	5,46 ± 0,00	5,64 ± 0,26	4,47 ± 0,03	4,37 ± 0,02	4,76 ± 0,01	5,09 ± 0,05	5,87 ± 0,01	4,69 ± 0,03
Sérine		4,85 ± 0,05	5,35 ± 0,02	5,53 ± 0,26	5,27 ± 0,03	4,76 ± 0,02	5,26 ± 0,03	5,56 ± 0,07	5,66 ± 0,05	5,55 ± 0,03
Glutamate		9,86 ± 0,16	11,06 ± 0,06	12,67 ± 0,62	9,96 ± 0,05	10,11 ± 0,09	11,15 ± 0,07	11,05 ± 0,11	11,97 ± 0,24	11,16 ± 0,15
Proline		18,45 ± 0,16	7,34 ± 0,08	7,07 ± 0,48	16,12 ± 0,03	14,93 ± 0,13	9,18 ± 0,05	9,87 ± 0,35	6,86 ± 0,24	12,79 ± 0,23
Glycine		3,67 ± 0,03	5,22 ± 0,04	5,43 ± 0,25	4,35 ± 0,01	4,32 ± 0,01	4,90 ± 0,01	5,03 ± 0,06	5,36 ± 0,08	4,53 ± 0,02
Alanine		4,47 ± 0,03	5,43 ± 0,04	5,97 ± 0,27	4,75 ± 0,03	4,73 ± 0,03	5,59 ± 0,03	5,39 ± 0,04	5,47 ± 0,09	5,42 ± 0,03
Cystéine		0,99 ± 0,12	1,32 ± 0,12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Valine		5,40 ± 0,11	5,64 ± 0,09	6,15 ± 0,30	4,60 ± 0,02	5,17 ± 0,03	5,41 ± 0,09	5,54 ± 0,11	5,15 ± 0,07	5,18 ± 0,05
Méthionine		1,88 ± 0,71	2,68 ± 0,14	1,69 ± 2,93	2,67 ± 0,10	2,73 ± 0,04	2,85 ± 0,07	2,35 ± 0,28	2,82 ± 0,24	2,54 ± 0,10
Isoleucine		4,59 ± 0,05	4,43 ± 0,01	6,26 ± 1,47	4,23 ± 0,05	4,81 ± 0,02	4,85 ± 0,03	4,60 ± 0,13	4,35 ± 0,13	4,35 ± 0,00
Leucine		6,72 ± 0,05	7,08 ± 0,05	8,41 ± 0,39	6,77 ± 0,01	7,03 ± 0,03	7,02 ± 0,02	6,87 ± 0,05	6,99 ± 0,03	6,90 ± 0,01
Tyrosine		3,62 ± 0,06	4,12 ± 0,05	4,68 ± 0,19	3,95 ± 0,11	3,83 ± 0,02	4,23 ± 0,03	4,13 ± 0,17	4,89 ± 0,18	4,02 ± 0,03
Phénylalanine		4,66 ± 0,08	4,41 ± 0,02	5,59 ± 0,25	4,89 ± 0,09	5,04 ± 0,04	4,70 ± 0,04	4,59 ± 0,17	4,76 ± 0,21	4,45 ± 0,02
Histidine		2,91 ± 0,05	5,38 ± 0,00	7,59 ± 0,36	5,92 ± 0,03	5,96 ± 0,02	5,63 ± 0,03	5,24 ± 0,01	4,57 ± 0,05	4,54 ± 0,04
Lysine		7,59 ± 0,09	10,16 ± 0,05	9,33 ± 0,45	9,35 ± 0,16	8,90 ± 0,10	8,76 ± 0,05	9,47 ± 0,46	10,11 ± 0,49	9,22 ± 0,07
Arginine		6,00 ± 0,09	5,17 ± 0,03	5,60 ± 0,24	4,55 ± 0,10	4,77 ± 0,04	6,38 ± 0,06	5,92 ± 0,21	5,07 ± 0,20	5,01 ± 0,02

Annexe 1. Suite.

Acide aminé	Famille Espèce	Boraginaceae <i>Echium vulgare</i>	Ericaceae <i>Calluna vulgaris</i>	Fabaceae <i>Medicago sativa</i>	Lythraceae <i>Lythrum salicaria</i>	Orobanchaceae <i>Odontites luteus</i>	Resedaceae <i>Reseda lutea</i>	Salicaceae <i>Salix alba</i>	<i>Salix caprea</i>
Asparagine		10,44 ± 0,03	9,80 ± 0,04	9,85 ± 8,08	10,56 ± 0,06	8,88 ± 0,34	11,79 ± 0,11	10,90 ± 0,17	10,18 ± 0,33
Thréonine		5,83 ± 0,11	4,89 ± 0,03	5,04 ± 0,00	5,23 ± 0,07	4,61 ± 0,02	5,23 ± 0,07	5,19 ± 0,09	5,19 ± 0,08
Sérine		5,30 ± 0,04	5,59 ± 0,03	5,37 ± 0,03	5,40 ± 0,06	4,87 ± 0,07	5,36 ± 0,01	5,66 ± 0,06	5,72 ± 0,08
Glutamate		11,52 ± 0,19	11,57 ± 0,13	11,87 ± 0,07	13,64 ± 0,12	10,37 ± 0,18	15,59 ± 0,17	12,0 ± 0,16	12,45 ± 0,49
Proline		9,13 ± 0,65	7,89 ± 0,86	8,87 ± 0,03	8,77 ± 0,65	16,38 ± 0,53	8,41 ± 0,56	4,22 ± 0,22	4,19 ± 0,10
Glycine		4,39 ± 0,05	4,36 ± 0,01	4,07 ± 0,11	4,27 ± 0,05	3,82 ± 0,04	4,13 ± 0,03	4,30 ± 0,07	4,30 ± 0,06
Alanine		4,48 ± 0,03	5,07 ± 0,02	5,20 ± 0,05	5,33 ± 0,07	4,64 ± 0,04	4,90 ± 0,01	5,00 ± 0,11	5,02 ± 0,08
Cystéine		0,27 ± 0,01	1,15 ± 0,05	0,95 ± 0,12	0,12 ± 0,08	0,81 ± 0,12	0,19 ± 0,02	1,45 ± 0,01	1,28 ± 0,07
Valine		5,45 ± 0,07	6,07 ± 0,04	6,00 ± 0,06	5,89 ± 0,10	5,44 ± 0,14	5,81 ± 0,01	5,92 ± 0,07	5,98 ± 0,13
Méthionine		0,79 ± 0,02	0,95 ± 0,05	2,69 ± 0,15	0,50 ± 0,07	2,46 ± 0,15	0,37 ± 0,04	2,49 ± 1,27	3,00 ± 0,66
Isoleucine		5,60 ± 0,10	4,78 ± 0,03	5,14 ± 0,04	4,82 ± 0,05	4,87 ± 0,06	4,70 ± 0,09	5,19 ± 0,12	5,10 ± 0,08
Leucine		7,75 ± 0,02	7,73 ± 0,02	7,81 ± 0,01	7,90 ± 0,08	7,30 ± 0,10	7,48 ± 0,10	7,87 ± 0,10	7,97 ± 0,07
Tyrosine		4,77 ± 0,02	4,29 ± 0,02	4,34 ± 0,08	4,07 ± 0,08	4,07 ± 0,12	4,01 ± 0,05	4,60 ± 0,14	4,46 ± 0,11
Phénylalanine		5,67 ± 0,02	5,07 ± 0,05	5,34 ± 0,08	5,18 ± 0,03	4,81 ± 0,14	5,01 ± 0,07	5,43 ± 0,18	5,32 ± 0,14
Histidine		3,63 ± 0,04	3,66 ± 0,01	3,41 ± 0,03	3,71 ± 0,05	3,70 ± 0,02	3,71 ± 0,04	3,73 ± 0,07	3,97 ± 0,08
Lysine		7,58 ± 0,10	7,92 ± 0,15	8,13 ± 0,10	8,03 ± 0,12	7,35 ± 0,28	7,50 ± 0,21	8,17 ± 0,10	8,47 ± 0,16
Arginine		6,39 ± 0,16	7,20 ± 0,04	5,96 ± 0,04	6,58 ± 0,10	5,62 ± 0,10	5,82 ± 0,11	7,82 ± 0,15	7,41 ± 0,20

Annexe 2. Tests statistiques (F) de comparaisons multiples (pairwise perMANOVA) des pollens floraux. Les valeurs en gras indiquent une différence significative entre deux espèces. La partie supérieure concerne les acides aminés essentiels (en gris) et la partie inférieure, les stérols (en blanc).

	<i>Aster tripolium</i>	<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Echium vulgare</i>	<i>Hedera helix</i>	<i>Helianthus annuus</i>	<i>Hypochaeris radicata</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Lythrum salicaria</i>	<i>Odontites luteus</i>
<i>Aster tripolium</i>		187,88	256,89	12,13	5,49	6,65	90,39	185,98	18,82
<i>Calluna vulgaris</i>	199,42		120,48	0,28	23,05	106,02	6,53	48,95	2,47
<i>Echium vulgare</i>	98,90	21,83		7,36	46,27	178,02	5,59	20,06	2,11
<i>Hedera helix</i>	280,80	72,58	10,35		8,64	11,35	0,30	1,38	1,49
<i>Helianthus annuus</i>	102,32	266,09	165,20	497,98		4,51	7,36	16,31	11,60
<i>Hypochaeris radicata</i>	127,96	92,92	69,74	120,53	156,90		18,60	71,57	15,32
<i>Medicago sativa</i>	66,40	83,28	2,89	59,17	52,66	26,89		13,05	1,39
<i>Lythrum salicaria</i>	7,86	51,22	25,70	48,83	18,38	31,47	46,25		1,02
<i>Odontites luteus</i>	137,21	49,30	16,49	45,77	260,68	98,63	32,49	21,65	
<i>Picris hieracioides</i>	3,32	38,49	32,92	35,66	7,12	40,68	42,81	6,52	21,09
<i>Reseda lutea</i>	105,98	76,87	79,21	154,03	113,20	107,15	38,90	23,74	105,49
<i>Salix alba</i>	52,68	15,75	0,29	4,69	93,35	19,56	32,97	25,33	6,90
<i>Salix caprea</i>	45,05	45,09	37,62	42,50	60,70	59,71	27,08	28,10	36,69
<i>Senecio inaequidens</i>	217,79	256,10	137,73	300,81	252,62	156,18	9,88	32,14	288,05
<i>Senecio jacobaea</i>	2,19	12,78	10,35	7,65	5,04	15,13	21,54	3,58	7,55
<i>Solidago gigantea</i>	9,63	57,23	39,22	54,37	40,06	52,56	11,42	8,91	30,31
<i>Tancetum vulgare</i>	1,69	15,07	14,73	13,16	4,28	17,49	20,38	2,85	8,91

Annexe 2. Suite.

	<i>Picris hieracioides</i>	<i>Reseda lutea</i>	<i>Salix alba</i>	<i>Salix caprea</i>	<i>Senecio inaequidens</i>	<i>Senecio jacobaea</i>	<i>Solidago gigantea</i>	<i>Tanacetum vulgare</i>
<i>Aster tripolium</i>	13,41	236,73	62,68	97,30	4,84	10,19	2,52	32,58
<i>Calluna vulgaris</i>	370,86	104,15	16,89	21,87	68,46	118,06	11,23	155,06
<i>Echium vulgare</i>	336,02	18,24	2,50	5,47	137,24	194,89	21,81	229,10
<i>Hedera helix</i>	15,25	2,87	5,80	13,51	13,61	19,23	8,16	31,00
<i>Helianthus annuus</i>	3,09	31,11	29,43	60,88	5,70	9,89	4,51	22,89
<i>Hypochaeris radicata</i>	4,72	153,06	51,65	80,96	8,09	17,30	3,65	39,61
<i>Medicago sativa</i>	9,26	2,91	4,15	8,22	8,85	12,88	10,61	15,64
<i>Lythrum salicaria</i>	160,77	6,54	5,55	8,89	51,49	78,13	8,53	99,85
<i>Odontites luteus</i>	20,68	1,43	1,16	2,17	20,43	28,86	12,48	42,54
<i>Picris hieracioides</i>		350,05	69,48	103,62	4,23	13,31	2,59	33,36
<i>Reseda lutea</i>	25,11		6,66	10,49	110,74	167,37	17,40	207,31
<i>Salix alba</i>	35,85	61,07		0,28	57,39	77,09	19,61	101,80
<i>Salix caprea</i>	33,26	54,20	66,62		102,53	136,86	59,40	189,57
<i>Senecio inaequidens</i>	39,52	123,70	86,07	66,39		2,98	1,73	15,34
<i>Senecio jacobaea</i>	2,95	9,69	14,23	18,19	5,11		0,60	6,48
<i>Solidago gigantea</i>	4,14	51,22	33,55	37,78	88,15	5,40		0,10
<i>Tanacetum vulgare</i>	1,60	12,45	19,72	22,11	13,65	5,59	2,75	

Annexe 3. Composition en acides aminés des diètes. Les concentrations sont exprimées en pourcentage de la composition totale en acides aminés. Les acides aminés essentiels sont en gras. N.D. : non détecté.

Acide aminé	Famille	Asteraceae	Cistaceae	Salicaceae	Fabaceae	Fabaceae
	Espèce	<i>Cirsium</i> s.l. (n = 3)	<i>Cistus</i> sp. (n = 3)	<i>Salix</i> sp. (n = 3)	<i>Trifolium repens</i> (n = 3)	<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose (n = 3)
Asparagine		9,30 \pm 0,17	10,76 \pm 0,18	10,71 \pm 0,31	10,06 \pm 0,28	10,06 \pm 0,28
Thréonine		4,35 \pm 0,01	4,73 \pm 0,11	5,22 \pm 0,07	4,99 \pm 0,01	4,99 \pm 0,01
Sérine		4,92 \pm 0,04	5,39 \pm 0,02	5,88 \pm 0,12	5,48 \pm 0,04	5,48 \pm 0,04
Glutamate		10,43 \pm 0,11	11,72 \pm 0,07	12,55 \pm 0,31	11,76 \pm 0,13	11,76 \pm 0,13
Proline		20,48 \pm 0,46	14,23 \pm 0,72	7,78 \pm 0,58	15,09 \pm 0,51	15,09 \pm 0,51
Glycine		3,89 \pm 0,01	3,91 \pm 0,07	4,46 \pm 0,05	3,90 \pm 0,02	3,90 \pm 0,02
Alanine		5,29 \pm 0,06	5,03 \pm 0,03	5,41 \pm 0,04	5,09 \pm 0,04	5,09 \pm 0,04
Cystéine		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Valine		5,24 \pm 0,05	5,56 \pm 0,04	5,78 \pm 0,12	5,71 \pm 0,06	5,71 \pm 0,06
Méthionine		N.D.	N.D.	F.D.	N.D.	N.D.
Isoleucine		3,98 \pm 0,05	4,48 \pm 0,17	4,96 \pm 0,05	4,75 \pm 0,02	4,75 \pm 0,02
Leucine		6,39 \pm 0,06	7,67 \pm 0,12	7,94 \pm 0,13	7,74 \pm 0,08	7,74 \pm 0,08
Tyrosine		3,38 \pm 0,07	3,89 \pm 0,23	4,27 \pm 0,07	3,81 \pm 0,08	3,81 \pm 0,08
Phénylalanine		4,13 \pm 0,02	4,76 \pm 0,21	5,27 \pm 0,05	5,02 \pm 0,06	5,02 \pm 0,06
Histidine		4,98 \pm 0,03	3,84 \pm 0,16	3,71 \pm 0,05	3,33 \pm 0,02	3,33 \pm 0,02
Lysine		8,94 \pm 0,04	7,96 \pm 0,05	8,33 \pm 0,14	7,93 \pm 0,10	7,93 \pm 0,10
Arginine		4,30 \pm 0,02	6,09 \pm 0,07	7,34 \pm 0,04	5,34 \pm 0,07	5,34 \pm 0,07

Annexe 4. Tests statistiques (F) de comparaison multiples (pairwise perMANOVA) des pollens d'élevage. Les valeurs en gras indiquent une différence significative entre deux espèces. La partie supérieure concerne les acides aminés essentiels (en gris) et la partie inférieure, les stérols (en blanc).

Espèce	<i>Asteraceae</i>	<i>Cistus</i> sp.	<i>Salix</i> sp.	<i>Trifolium repens</i>	<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose
<i>Cirsium</i> s.l.		2,65	43,43	29,63	24,20
<i>Cistus</i> sp.	26,75		5,44	6,56	4,99
<i>Salix</i> sp.	29,77	27,69		6,16	6,44
<i>Trifolium repens</i>	14,78	12,78	11,95		0,36
<i>Trifolium repens</i> + α -cellulose	14,74	12,69	12,54	0,01	