

UNIVERSITE DE MONS  
FACULTE DES SCIENCES  
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Impact de la diversité des ressources alimentaires sur le  
développement de microcolonies de *Bombus terrestris*  
*terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae)**

Directeur de mémoire  
Dr. Denis Michez

Mémoire de fin d'Etudes  
présenté par **Romain Moerman**  
En vue de l'obtention du grade  
de **Maître en Sciences**  
**Biologiques**

Année académique 2010-2011

**R. Moerman, 2011.** Impact de la diversité des ressources alimentaires sur le développement de microcolonies de *Bombus terrestris* (L.). Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, 88 p.

**Résumé :** Les abeilles jouent un rôle majeur dans nos écosystèmes de part leur diversité et leur intime relation avec les plantes. Cet équilibre est aujourd’hui menacé. De nombreuses causes ont déjà été citées comme le changement des pratiques agricoles, la fragmentation, la perte d’habitat, etc. Bon nombre de ces événements ont un impact direct sur la quantité et la qualité des ressources alimentaires nécessaires à la survie des abeilles. Le pollen est une ressource nécessaire pour le développement des larves et la bonne santé des adultes. Les nutriments clés du pollen sont, entre autres, les protéines et les stérols.

Lors de cette étude, nous avons réalisé des élevages de microcolonies de bourdons terrestres disposant de combinaisons alimentaires variées. Ces combinaisons alimentaires ont été établies sur base d’une étude précédente (Chyzy, 2009). Les résultats indiquent une meilleure qualité nutritionnelle des pollens de *Cytisus scoparius* et de *Sorbus aucuparia* par rapport aux pollens de *Calluna vulgaris* et de *Cistus* sp. Des analyses de stérols, de protéines et de sucres ont été entreprises sur les différents pollens utilisés. Les résultats confirment le rôle clé d’une diète riche en protéines et soulignent l’importance du 24-méthylènecholestérol pour le développement des microcolonies.

Nous confirmons l’hypothèse de Roelandts (2010) qu’une colonie consomme plus de nectar lorsqu’elle est nourrie avec un pollen de mauvaise qualité. De même, nos résultats indiquent, comme souligné par Rasmont *et al.* (2005), un rôle majeur du  $\beta$ -sitostérol dans l’appétence du pollen.

Ainsi, certaines ressources ont un rôle clé dans le développement de colonies de bourdons par la composition et qualité nutritionnelle de leur pollen. Leur disparition pourrait certainement avoir des conséquences sur le maintien des populations de *Bombus*.

**Mots-clés :** *Bombus terrestris* L., pollens, protéines, stérols, diversité

## Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Pierre Rasmont qui m'a accueilli dans son service. Je tiens aussi à le remercier pour ses passionnants cours de zoologie et d'écologie.

Ce travail n'aurait pas pu se réaliser sans les idées originales et l'aide du Dr. Denis Michez. Je le remercie chaleureusement pour son excellent encadrement et ses encouragements.

Je remercie le Professeur Georges Lognay pour son accueil et ses remarques avisées lors de mes déplacements à Gembloux. Je tiens aussi à remercier l'équipe de chimie analytique pour leur camaraderie.

Je remercie le Professeur Ruddy Wattiez de m'avoir ouvert les portes de son service. Je tiens aussi à souligner l'aide précieuse de Mme. Caroline Rosier.

Pour son accueil lors de mes déplacements à Avignon, je remercie toute l'équipe du Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles du Pr. Bernard Vaissière et particulièrement le Dr. Sophie Suchail pour son encadrement.

Je remercie chaleureusement les membres du jury pour la lecture de mon travail.

Je remercie aussi la société *BIOBEST* pour la fourniture du matériel nécessaire à l'élevage des microcolonies.

Ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans l'aide technique de M. Albert Michez qui a fourni ruches et abeilles lors de cette étude, pour cela, je le remercie très amicalement.

Je tiens à remercier Gaëlle, Mathias, Elodie et Gaëtan pour leur amitié et leur humour durant cette année de travail.

Merci à mes parents et à Isabelle pour leur soutien au long de ces années d'études.

Enfin, merci à tous les membres du service, en particulier Maryse, pour leur aide.

1. INTRODUCTION .....	6
1.1. Conservation des apoïdes .....	6
1.1.1. Risques pesant sur les Apoïdes.....	6
1.1.2. Stratégies de conservation .....	9
1.2. Objectifs .....	10
1.3. Cadre géographique.....	11
1.4. Modèles biologiques.....	12
1.4.1. <i>Bombus terrestris</i> L.....	12
1.4.2. Ressources alimentaires.....	16
1.5. Le pollen.....	21
1.5.1. Les stérols .....	21
1.5.2. Les protéines.....	23
1.5.3. Les sucres.....	24
2. MATERIEL ET METHODE .....	25
2.1. Collecte du pollen .....	25
2.1.1. Pollen non disponible dans le commerce .....	25
2.1.1. Le pollen commercial.....	27
2.2. Stockage du pollen.....	27
2.3. Préparation du pollen destiné à nourrir les bourdons .....	28
2.4. Microcolonie et élevage.....	28
2.5. Combinaisons alimentaires .....	30
2.6. Analyse des stérols.....	31
2.7. Analyse des protéines.....	33
2.8. Analyse des sucres.....	36
2.9. Analyses statistiques.....	37
3. RESULTATS.....	38
3.1. Développement des microcolonies.....	38
3.1.1. Poids des larves par microcolonies .....	38
3.1.2. Poids moyen d'une larve .....	39
3.1.3. Nombre de larves vivantes par microcolonies .....	40
3.1.4. Consommation de pollen 5 jours avant la ponte.....	41

3.1.5.	Consommation de pollen 12 jours après la ponte .....	42
3.1.6.	Mortalité des ouvrières .....	43
3.1.7.	Pourcentage du nombre de larves éjectées .....	43
3.1.8.	Efficacité du pollen .....	43
3.1.9.	Consommation de sirop .....	44
3.2.	Composition chimique des pelotes de pollen.....	45
3.2.1.	Analyse des stérols.....	45
3.2.2.	Analyse statistique des composés stéroliques.....	51
3.2.3.	Analyse des protéines .....	54
3.2.4.	Analyse des sucres .....	55
4.	DISCUSSION.....	56
4.1.	Différence de composition entre les pelotes d' <i>Apis</i> et de <i>Bombus</i> .....	56
4.2.	Différence entre <i>Calluna vulgaris</i> et <i>Vaccinium sp.</i> .....	57
4.3.	Analyse et extraction des protéines.....	57
4.4.	Influence de la composition du pollen sur le développement de microcolonies .	58
4.5.	Impact de la diversité des ressources sur le développement de microcolonies ....	60
4.6.	Mesures de conservations .....	61
5.	CONCLUSION .....	62
6.	PERSPECTIVES.....	63
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	64
8.	ANNEXES .....	70

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. Conservation des apoïdes

### 1.1.1. Risques pesant sur les apoïdes

Il est maintenant admis que les abeilles sont en déclin (Potts *et al.*, 2010). Même si la crise est générale sur l'ensemble de la planète, certaines zones du globe doivent faire face à un manque de connaissance flagrant. Ainsi, un seul travail à grande échelle a été réalisé et montre la diminution significative des abeilles en Angleterre et aux Pays-Bas (Biesmeijer *et al.*, 2006).

Le territoire le mieux documenté en ce qui concerne l'apifaune est l'Europe. Les données regroupent des informations à la fois régionales et continentales. Cependant, les connaissances au niveau de la région Ouest-Paléarctique sont irrégulières (Patiny *et al.*, 2009).

C'est en Europe que l'ampleur de "la crise de la pollinisation", pour reprendre le terme de Kearns (1998), est le mieux documenté. Dans certaines régions européennes, plus de 65% des espèces d'abeilles sont sur liste rouge (Patiny *et al.*, 2009). Ainsi, pour la Belgique, Rasmont (1988) indique la raréfaction de 14 des 31 espèces de bourdons présentes historiquement. Des études plus localisées sur la France et la Belgique ont montré que sur 360 espèces d'apoïdes prises en compte, 91 sont en déclin, 145 sont stables, 39 s'étendent et 85 ont un statut indéterminé (Rasmont *et al.*, 2005). Gardons cependant à l'esprit que certaines zones restent préservées et doivent faire l'objet de notre plus grande attention. Ainsi, Rasmont (2003) souligne l'exceptionnel maintien de la diversité entomofaunique du sud de la France. Il semble aussi que certaines espèces ne soient pas affectées par ce déclin, citons pour l'Europe *Bombus terrestris*, *B. lucorum*, *B. lapidarius*, *B. pratorum*, *B. hortorum* et *B. pascuorum* (Goulson *et al.*, 2008) ou encore *Colletes hederæ* (Vereecken, 2009).

Les causes de ce déclin sont multiples et peuvent se cumuler. Grixti (2009) en résume quelques-unes comme le changement des pratiques agricoles, l'urbanisation, l'utilisation intensive de pesticides ou encore l'apport de parasites par les colonies commerciales de bourdons. D'autres causes peuvent être ajoutées à cette liste suivant le travail de Goulson *et al.* (2008). Ils citent la diminution des ressources florales, la perte de lieux de nidification ou encore la fragmentation des habitats. Williams (2009)

y ajoute les changements climatiques qui influencent directement ou indirectement les ressources alimentaires ou les lieux de nidification. La déforestation pourrait être la principale menace dans certaines parties du monde (Freitas *et al.*, 2009 ; Batley & Hogendoorn, 2009 ; Oldroyd & Nanork, 2009).

Dans certaines régions du globe, c'est le défaut de connaissance des apoïdes qui pose problème. On constate ainsi un manque d'échantillons et d'espèces connues pour la communauté des abeilles africaines (Eardley *et al.*, 2009) et australiennes (Bartley & Hogendoorn, 2009). Le manque d'informations dans ces régions rend difficile la mise au point de programme de conservation (Eardley *et al.*, 2009 ; Batley & Hogendoorn, 2009).

De manière globale, les perturbations humaines ont un effet négatif sur l'abondance et la richesse des espèces d'abeilles (Winfrey *et al.*, 2009).

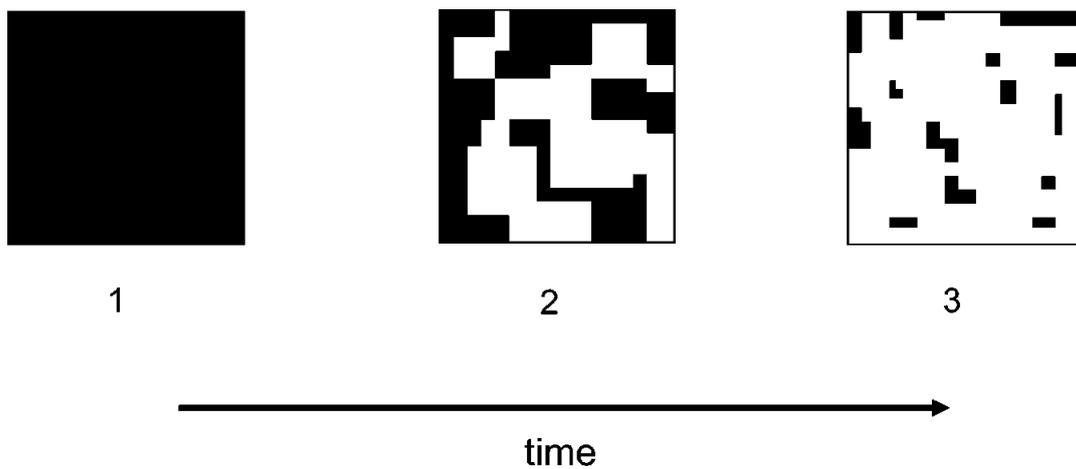
La déforestation et l'intensification de l'agriculture sont parmi les principales menaces pesant sur les abeilles. En effet, la réduction de la diversité végétale diminue les opportunités de nidification et les ressources alimentaires des abeilles (Freitas *et al.*, 2009).

En Belgique, il a été montré que les pratiques de désherbage et la perte importante des cultures de Fabaceae peuvent expliquer la disparition de nombreuses espèces (Rasmont & Mersch, 1988).

Une autre source de problème pour les apoïdes, mais qui reste peu étendue, est l'introduction d'espèces invasives. Depuis maintenant quelques années, des sociétés comme *BIOBEST* se sont spécialisées dans la production et la vente de bourdons. Le nombre de colonies produites par an est estimé à 600.000 (prof. Rasmont, com. pers.). Cette commercialisation vise essentiellement à améliorer la pollinisation sous serre comme pour la culture des tomates. Il arrive que des bourdons s'échappent et se retrouvent dans la nature. La question posée est de connaître l'impact de cette intrusion sur la faune locale. Actuellement peu d'études ont été menées sur le sujet et les résultats sont variables selon les régions. On sait que *Bombus terrestris* est une espèce à prédisposition invasive très grande. En effet, l'arrivée d'un nombre extrêmement restreint de reines sur un territoire suffit au succès de l'invasion et ce, malgré une pauvreté de la variabilité génétique (Schmid-Hempel *et al.*, 2007). Inari *et al.* (2005) indiquent la possibilité d'une compétition interspécifique entre *B. terrestris* et les bourdons natifs dans la région d'Hokkaido. Ings *et al.* (2009) montrent pourtant que, pour le Sud de la France, l'espèce intrusive potentielle qu'est *B. t. sassaricus* ne constitue pas un risque pour les espèces natives

qui représentent une compétition trop importante. Cependant, des interférences génétiques ne sont pas exclues.

La fragmentation des habitats est une autre perturbation de l'écosystème. Une définition pertinente est celle de Wilcove (1986) qui considère la fragmentation comme le processus durant lequel une large étendue d'habitat est divisée en un nombre de petits habitats séparés les uns des autres par des habitats différents de l'original (fig.1).



**Figure 1** : progression de la fragmentation au cours du temps (Wilcove *et al.*, 1986)

La fragmentation d'une ressource provoque une diminution de sa densité. Or, la densité florale affecte directement la diversité des pollinisateurs présents (Hegland *et al.*, 2006). De plus, la densité mais aussi la diversité jouent un effet attracteur puissant sur les insectes cherchant le pollen (Lazaro & Totland, 2010).

Une des causes primaires de la perte de biodiversité est donc la destruction et la fragmentation d'habitats, mais le taux d'extinction peut être accéléré par d'autres facteurs déjà cités (Krauss *et al.*, 2010).

### 1.1.2. Stratégies de conservation

Le terme "conservation" peut être interprété de différentes manières selon les valeurs personnelles de chacun (Williams *et al.*, 2009). En ce qui nous concerne, nous prendrons la définition de Lévêque (2001) : *La conservation est une démarche qui consiste à prendre en compte la viabilité à long terme des écosystèmes dans les projets de gestion des ressources et des milieux (...) L'homme peut intervenir dans les processus naturels ; c'est une philosophie de la gestion de l'environnement qui n'entraîne ni son gaspillage, ni son épuisement.*

La régression des espèces animales est aujourd'hui souvent déplorée mais les insectes attirent peu l'attention du public (Rasmont, 2003). Leur importance dans l'écosystème est pourtant cruciale quand on sait que les abeilles sont responsables de la pollinisation de 80% des angiospermes (Buchmann & Nabhan, 1996). Il est donc nécessaire de mettre en œuvre des stratégies futures de conservation des abeilles. Souvent le problème de départ provient du manque de connaissance de l'apifaune elle-même. Comment pourrions-nous mettre sur pied des programmes de conservation valides sans même connaître ce qui est à protéger. Brown (2009) souligne ainsi la nécessité de soutenir les scientifiques et en particulier les taxonomistes spécialistes de la description des espèces d'abeilles.

Vu l'ampleur du problème, des solutions à l'échelle mondiale doivent être trouvées avec des applications répondant aux spécificités locales. Il est ainsi nécessaire de passer par des organisations regroupant scientifiques et politiques. Un point de départ important a été la convention sur la diversité biologique ouverte lors du Sommet de Rio en 1992 (<http://www.cbd.int/>).

Des programmes locaux se mettent aussi en place comme le plan *MAYA* qui vise à sauvegarder les populations d'abeilles mellifères wallonnes. Citons aussi l'*API* (*African Pollinator Initiative*) pour l'organisation d'un consortium sur la conservation des pollinisateurs en Afrique. A une plus grande échelle, citons le projet européen *ALARM* (*Assesing LArge scale Risks for biodiversity whith tested Methods*) (<http://www.alarmproject.net/alarm/>) qui vise à mieux comprendre les risques des modifications environnementales sur la biodiversité et enfin, le programme *STEP* (*Status and Trends of European Pollinators*), dont l'objectif est d'évaluer le statut des pollinisateurs européens et de quantifier l'impact de différentes menaces sur ces derniers (<http://www.step-project.net>). Il est important de mettre sur pied des études de grandes ampleurs tout en restant prudent quant à l'extrapolation des résultats observés à plus petite échelle (Winfrey *et al.*, 2009).

Pour Goulson *et al.* (2008), un suivi à long terme des populations de bourdons est nécessaire pour une meilleure compréhension de leur statut et pour construire les bases des études futures. Ils ajoutent que cela est d'autant plus important dans certaines régions, comme l'Amérique du Nord, où il y a peu d'informations sur l'ampleur du déclin. Cette remarque devrait pouvoir s'élargir à toutes les abeilles à travers le monde. Ce manque d'informations a été partiellement compensé grâce à l'étude récente de Cameron *et al.* (2011) qui indiquent que l'abondance relative de certaines espèces d'Amérique du Nord a décliné de plus de 96%.

Les facteurs provoquant le déclin des abeilles sont connus, mais c'est aux scientifiques de trouver les arguments pour montrer aux politiques le rôle des abeilles dans la bonne santé de la planète et des populations humaines (Brown & Paxton, 2009).

## 1.2. Objectifs

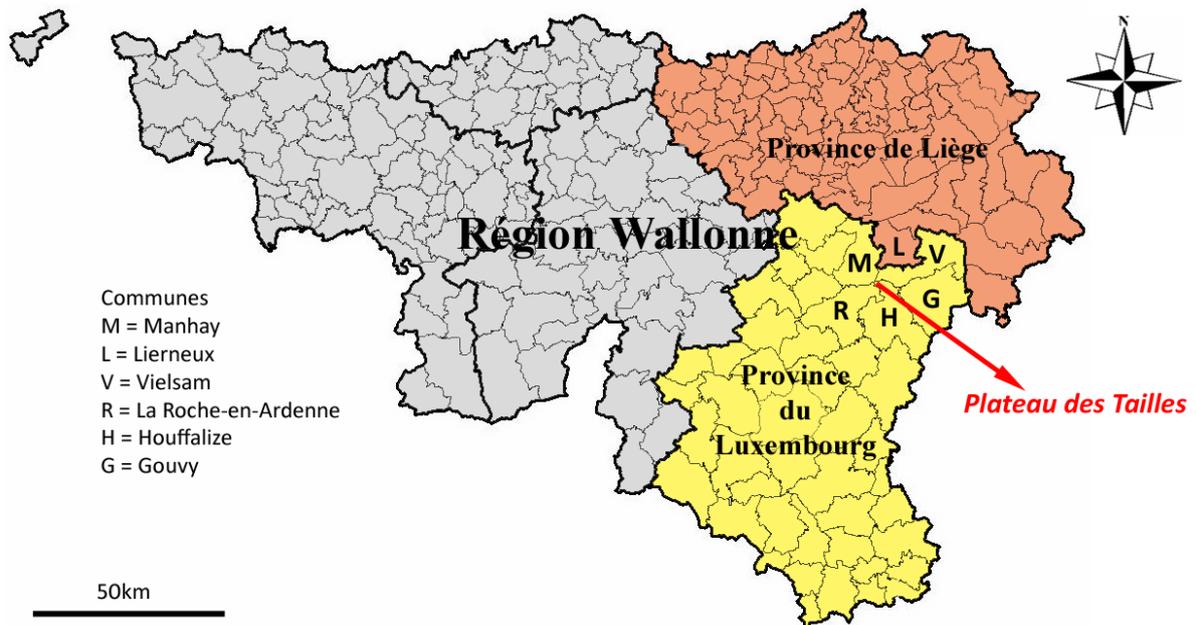
De nombreuses études tentent d'identifier les facteurs provoquant la diminution de la biodiversité ou de lister les espèces les plus en danger. Cependant, peu d'études visent à mettre sur pied des tests expérimentaux pouvant démontrer l'importance de certaines ressources clés ou encore l'impact qu'aurait une modification du paysage sur la survie des pollinisateurs (Lazaro & Totland, 2010 ; Haddad & Baum, 1999).

Même si la diversité des ressources est considérée comme nécessaire pour le bon maintien de celle des visiteurs, il est important dans une démarche scientifique d'éviter les raccourcis empiriques et de vérifier par l'expérience les hypothèses proposées.

A l'aide d'un protocole d'élevage de microcolonies et d'analyses micro-quantitatives de pollen, notre objectif est d'évaluer l'importance de la diversité des ressources alimentaires pour le bourdon terrestre. Nous devrions ainsi, d'une part, préciser l'effet de la disparition de certaines ressources sur le développement des colonies et d'autre part, souligner les nutriments essentiels des ressources clés.

### 1.3. Cadre géographique

Afin de rapprocher cette étude des conditions naturelles, nous nous sommes basés sur le site du Plateau des Tailles (Haute-Ardenne) pour le choix des modèles biologiques (fig. 2). Un des milieux les plus intéressants est la tourbière, on y trouve des populations fragmentaires d'espèces végétales rares comme *Vaccinium uliginosum* L. Ce milieu est riche en plantes adaptées aux milieux gorgés d'eau (Jaquemart *et al.*, 2008).



**Figure 2** : position du site du Plateau des Tailles en Wallonie d'après Chyzy (2009)

Les visiteurs et pollinisateurs de cette zone sont aujourd'hui bien connus (Mayer *et al.*, soumis). Nous savons que les principales ressources alimentaires des visiteurs de *V. uliginosum* L. sont des Ericaceae, *Cytisus scoparius* Link et *Sorbus aucuparia* L. Nous savons aussi que, parmi les espèces de bourdons présentes, on rencontre *Bombus pratorum* (L.), *B. lucorum* (L.), *B. cryptarum* (Fabricius), *B. pascuorum* (Scopoli) et *B. bohemicus* Seidl (Jaquemart, 1996). On peut y ajouter *Bombus jonellus* Kirby, ainsi que la collecte de *B. campestris* (Panzer), *B. hortorum* (L.), *B. hypnorum* (L.), *B. lapidarius* (L.), *B. terrestris* (L.) et *B. sylvestris* (Lepelletier) identifiés lors du travail de Chyzy (2009) et de Brédart (2010). C'est également au cours de ce dernier travail que l'espèce *B. terrestris terrestris* (L.) a été déterminée par l'analyse de phéromones des mâles. A ces visiteurs, s'ajoutent l'*Apis mellifera* L., deux andrènes et des diptères de la famille des Syrphidae.

## 1.4. Modèles biologiques

### 1.4.1. *Bombus terrestris* (L.)

L'espèce de bourdon utilisée pour cette étude est *Bombus terrestris terrestris* (fig. 3). L'espèce *Bombus terrestris*, et particulièrement la sous-espèce *terrestris*, est une des plus abondantes et répandues dans la région Ouest-Paléarctique (Rasmont *et al.*, 2008), (fig. 4). Ce taxon est identifié comme visiteur de *Vaccinium uliginosum* L. Il est un des modèles les plus utilisés dans les études de test alimentaire (Regali, 1995 ; Regali & Rasmont, 1996 ; Ribeiro *et al.*, 1996 ; Génissel *et al.*, 2002 ; Tasei & Aupinel, 2008 ; Roelandts 2010), ce qui permet une richesse d'informations. Les modalités d'élevage sont également maîtrisées.



**Figure 3** : *Bombus terrestris terrestris* (L.) sur son couvain (R. Moerman)

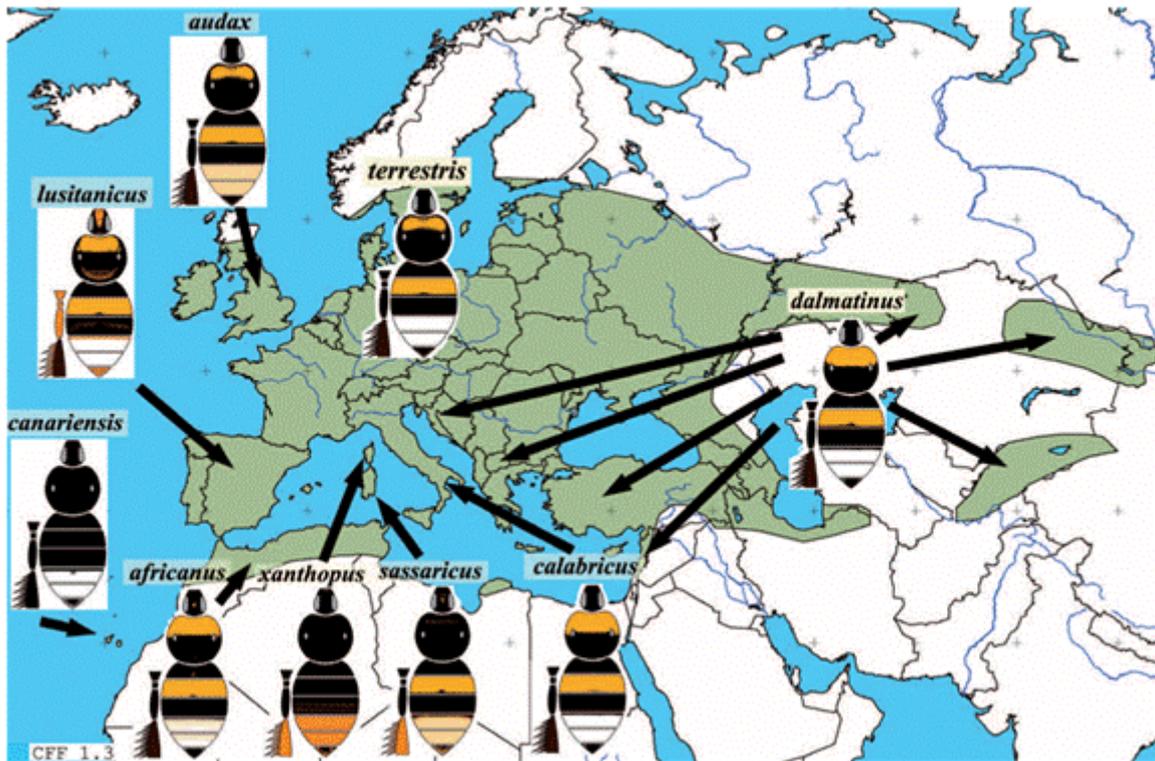


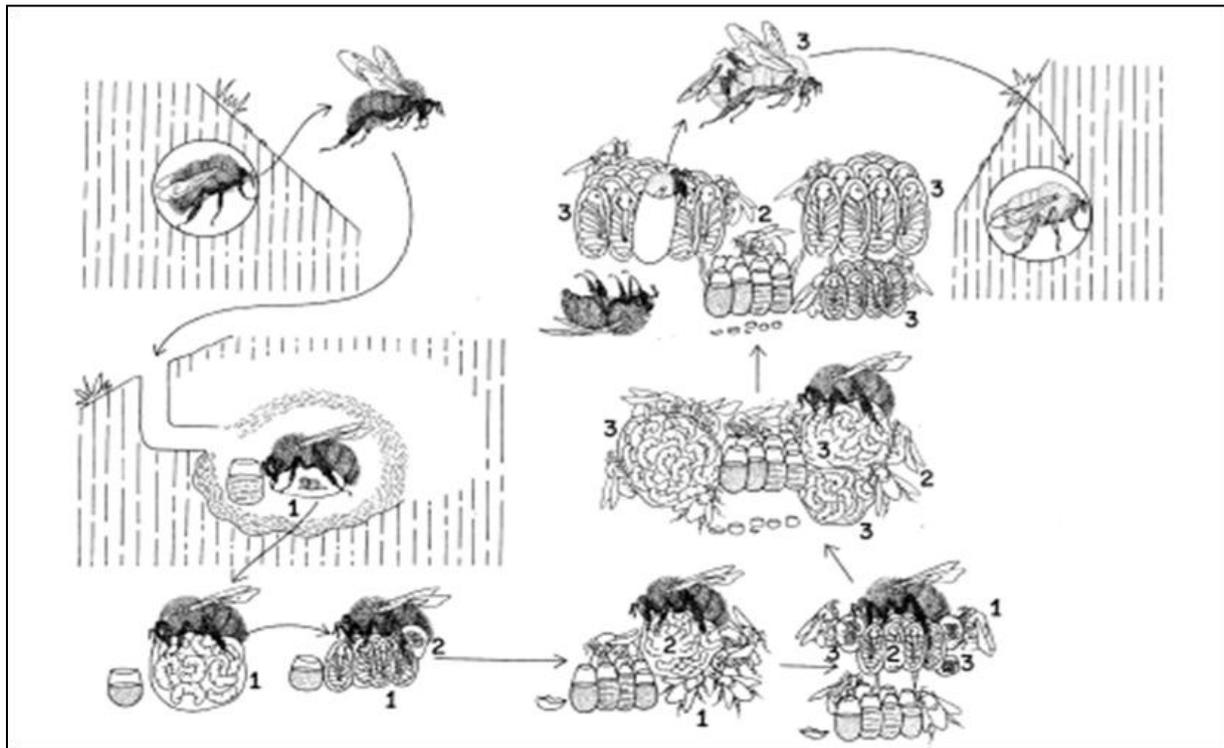
Figure 4 : Carte de distribution de *Bombus terrestris* (Rasmont et al., 2008)

La description du cycle de *Bombus terrestris*, comme indiqué par Alford (1975), peut se résumer comme suit (fig. 5) : à la fin de l'été, une reine vierge est fécondée par un mâle. Celle-ci cherche alors un abri pour sa diapause hivernale d'une durée de 6 à 9 mois, selon les températures printanières. Les membres des autres castes meurent avant l'hiver. Au printemps, la reine émerge et part à la recherche d'un endroit pour y fonder son nid (souvent un ancien abri de micromammifère). Elle se nourrit alors de nectar et de pollen dont les protéines et les stérols sont nécessaires au développement de ses ovaires (Heinrich, 1979). Le nid trouvé, elle pond et couve ses œufs tout en se nourrissant dans un pot à miel préalablement confectionné. La reine utilise sa thermorégulation pour maintenir la bonne température de sa descendance. Une fois que les premières ouvrières émergent des cocons, la reine ne fait plus que pondre et les ouvrières s'attellent à la recherche de pollen, de nectar et au bon maintien de l'intégrité du nid.

Lorsque la reine n'a plus de spermatozoïde dans sa spermathèque, elle pond des œufs non fécondés qui donnent des mâles (haploïdes). Certains œufs pondus par les ouvrières et non détruits par la reine donnent également naissance à des mâles. Au début de la colonie, une phéromone contraceptive libérée par la reine inhibe la ponte des ouvrières. Avec l'augmentation de la taille de la colonie, son effet s'estompe. A ce stade, les ouvrières sont nombreuses et le ratio nombre d'ouvrières/œufs est élevé. Les futurs descendants reçoivent ainsi une quantité de

nourriture suffisante au développement important de leur taille et donc de leurs structures reproductrices. Les jeunes reines quittent le nid et s'accouplent avec des mâles.

Les œufs pondus (nombre variable selon l'espèce) dans un même compartiment évoluent vers les stades larves, pupes qui sont alors séparées les unes des autres, et enfin le stade adulte (imago) (Heinrich, 1979).



**Figure 5** : Illustration du cycle de vie d'une colonie de bourdons (Heinrich, 1979) montrant la première ponte de la reine (1) et le développement des larves (2) jusqu'à l'apparition d'une nouvelle reine (3).

Les bourdons sont classés parmi les insectes eusociaux primitifs en raison de l'existence d'une période solitaire de la reine (Michener, 1974). Durant la période active de la colonie, les ouvrières passent un temps considérable à élever les larves de la reine qui donneront des femelles. La vie de la colonie peut se subdiviser en deux phases principales (Alford 1975). La première est la phase sociale caractérisée par une coopération. A ce moment, la régulation de la reproduction des ouvrières est contrôlée par la perception de phéromones non volatiles émises par la reine et transmises par contact antennaire direct (Alaux *et al.*, 2007). Le contrôle de la reine est aussi assumé par des comportements particuliers de type dominance agressive (Röseler & Van Honk 1990). La seconde phase est caractérisée par une compétition entre la reine et les ouvrières. Il semble que la régulation de la reproduction chez *B. terrestris* ne soit pas déterminée par simple changement dans la capacité d'inhibition

de la reine, mais que le rôle des ouvrières est plus important que ce qu'il n'y paraît (Bloch & Hefetz, 1999).

Les ouvrières sont donc capables de pondre des œufs mâles dans certaines conditions, montrant ainsi une plasticité reproductive (Alaux *et al.*, 2007). On considère qu'il faut environ 7 jours pour que certaines des ouvrières isolées de la reine se mettent à pondre. *A contrario*, dans les colonies avec reine, la ponte des ouvrières est inhibée jusqu'à 30 jours (Duchateau & Velthuis, 1989).

### 1.4.2. Ressources alimentaires

#### *Cytisus scoparius* (L.) Link

Le *C. scoparius* (fig. 6 et 7), ou genêt à balais, est un arbuste de la classe des Magnoliopsida, de l'ordre des Fabales et de la famille des Fabaceae. Ses larges fleurs jaunes (16-20 mm) ont un mécanisme de pollinisation explosive (Stout, 2000). Les bourdons sont les plus efficaces pour déclencher ce mécanisme, et spécialement les espèces *B. terrestris* (L.) et *B. lapidarius* (L.) de petite taille ou de taille moyenne. Le pollen est aussi collecté, sur les fleurs ouvertes, par *Apis mellifera* L. et certains diptères (syrphidae), les fleurs n'offrent pas de nectar (Stout, 2000).

Nous n'avons pas pu trouver d'information sur le contenu protéique du genêt. Il a été montré que pour les Fabaceae, il est d'environ 40 % de masse sèche (Roulston *et al.*, 2000). Cependant, vu la variabilité des espèces de Fabaceae, la valeur pour le genêt pourrait être tout autre (Roulston *et al.*, 2000).

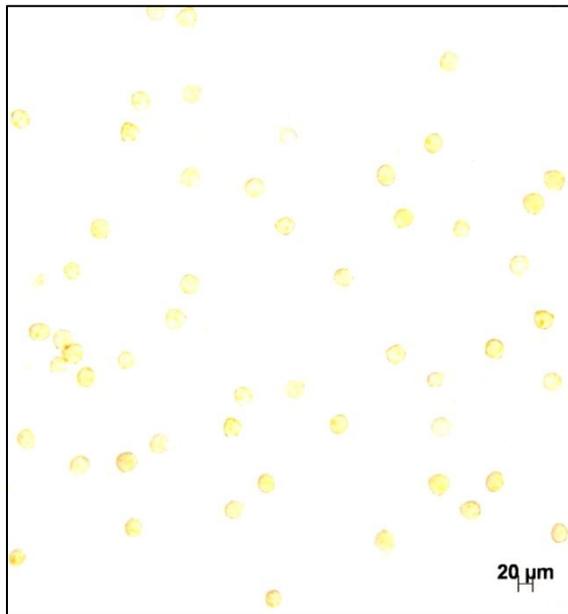


Figure 6 : Pollen de *Cytisus scoparius* (R. Moerman)

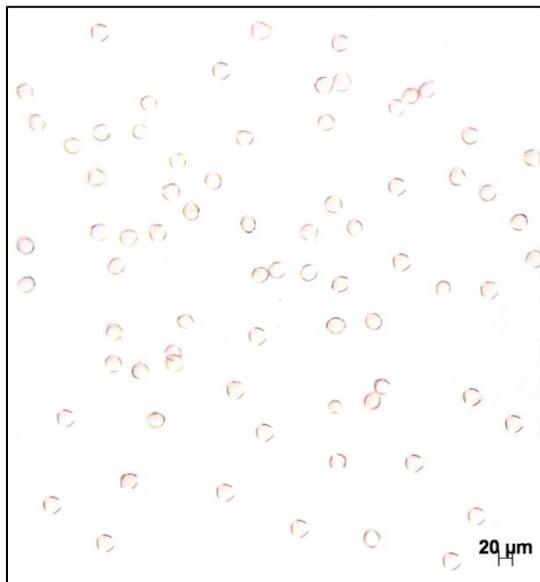


Figure 7 : *Cytisus scoparius* (R. Moerman)

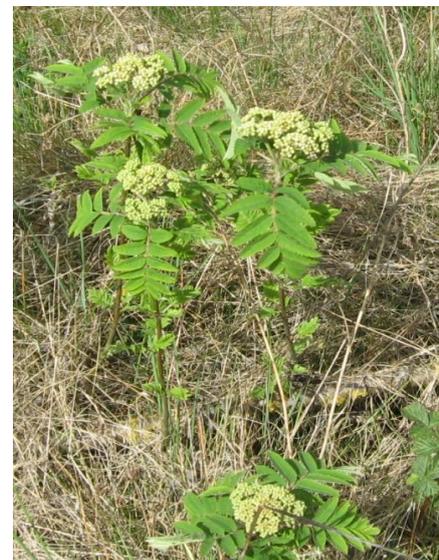
*Sorbus aucuparia* L.

Le *S. aucuparia* (fig. 8 et 9), ou sorbier des oiseleurs, est un arbre de la classe des Magnoliopsida, de l'ordre des Rosales et de la famille des Rosaceae. Raspé *et al.* (2000) décrivent cette plante comme un arbre moyen pouvant atteindre de 15 à 20 m, dont les bourgeons apparaissent au début du printemps et dont les nombreuses fleurs, d'un diamètre pouvant aller de 8 à 10 mm, sont portées par une inflorescence en corymbe et s'ouvrent de mai à juin. Par temps chaud, les étamines divergent pour exposer leur abondant nectar. Ce dernier contient en majorité du glucose et du fructose (obs. pers.). L'espèce est présente dans une vaste partie de l'Europe et est caractéristique des sols bien drainés (Raspé *et al.*, 2000). De manière générale, les diptères sont les principaux visiteurs, suivis des hyménoptères (Pias & Guitian, 2006). En Haute-Ardenne, les fleurs sont principalement visitées par les diptères (87-89%) et particulièrement les Syrphidae et les Empididae ; abeilles et bourdons ne représentent que 6 à 7 % des visiteurs (Raspé *et al.*, 2000).

Le pourcentage de protéines dans le pollen de *Sorbus aucuparia* est évalué à 34,8 % de masse sèche (Roulston *et al.*, 2000).



**Figure 8 :** Pollen de *Sorbus aucuparia* L. (R. Moerman)  
(R. moerman)



**Figure 9 :** Jeune *Sorbus aucuparia* L.

*Vaccinium uliginosum* L.

Le *V. uliginosum* (fig. 10), ou myrtille du loup, est un sous-arbrisseau de la classe des Magnoliopsida, de l'ordre des Ericales et de la famille des Ericaceae. On le trouve généralement sur un sol de type acide et humide (Jacquemart, 1996). Une caractéristique de cette espèce est de porter, contrairement aux autres Ericaceae, un ovaire infère (Bastin *et al.*, 1996). Les fleurs forment des pseudo-ombelles sub-terminales comprenant 1 à 4 fleurs groupées (Chyzy, 2009). En général, il y a une seule période de floraison entre la fin du printemps et le début de l'été, la pollinisation dure de 5 à 8 semaines (Jacquemart, 1996). Les



**Figure. 10 :** *Vaccinium uliginosum* (Chyzy, 2009)

principaux insectes pollinisateurs en Haute Belgique sont les reines de bourdons avec une dominance de l'espèce *B. pratorum* (Jacquemart, 1993 a ; b). La composition du nectar est dominée par le fructose et le glucose avec une quantité moyenne de nectar par fleur de 1,6  $\mu$ L (Jacquemart, 1992). La concentration en sucre déterminée par l'auteur est inférieure aux valeurs citées comme attractives (9,09-28,49%) pour les bourdons.

*Salix caprea* L.

Le *S. caprea* (fig. 11 et 12), ou saule marsault, est un petit arbre pouvant atteindre une hauteur de 5 à 18 m. La floraison a lieu de mars à septembre avant la feuillaison. Il s'agit d'une plante dioïque dont les chatons sont unisexués, odorants, dressés et sessiles. Les chatons mâles ont des étamines velues et des anthères jaunes très riches en pollen. Cet arbre se classe dans les espèces héliophiles pionnières.

Le genre *Salix* est considéré comme une source importante de pollen de même que d'autres arbres du genre *Acer* (érable) ou *Prunus* (cerisier), au début du printemps (Keller *et al.*, 2004). Il donne de bon résultats lors d'études sur le développement de microcolonies de bourdons (Génissel *et al.*, 2002, Taseï & Aupinel 2008).

Le pourcentage de protéines dans le pollen de *Salix caprea* est évalué à 36,8 % de masse sèche (Roulston *et al.*, 2000).

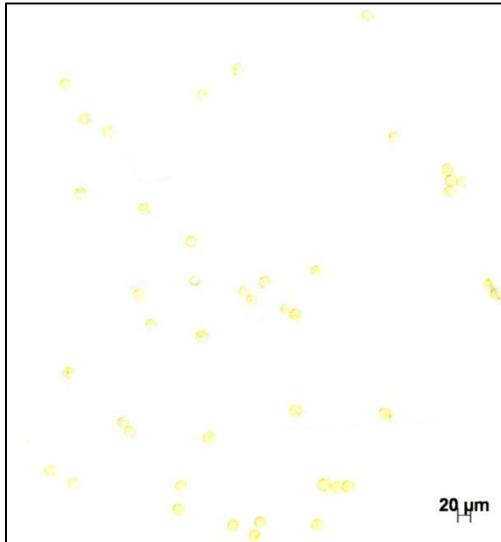


Fig. 11 : pollen de *Salix caprea* (R. Moerman)



Fig. 12 : *Salix caprea* L. (R.moerman)

### *Cistus* sp.

Le genre *Cistus* (fig. 13 et 14), ou ciste, appartient à la famille des Cistaceae. Les étamines sont nombreuses, l'ovaire libre et les fleurs peuvent être jaunes, rouges ou blanches. On compte environ 70 espèces répandues dans les régions tempérées de l'hémisphère boréal (Coste, 1990).

Le pollen de ciste a été décrit comme de mauvaise qualité dans différentes études traitant du développement d'une colonie de bourdons (Taseï & Aupinel, 2008 ; Roelandts, 2010). Le taux de protéine (% poids sec) est de 14,4 % (Taseï & Aupinel, 2008).

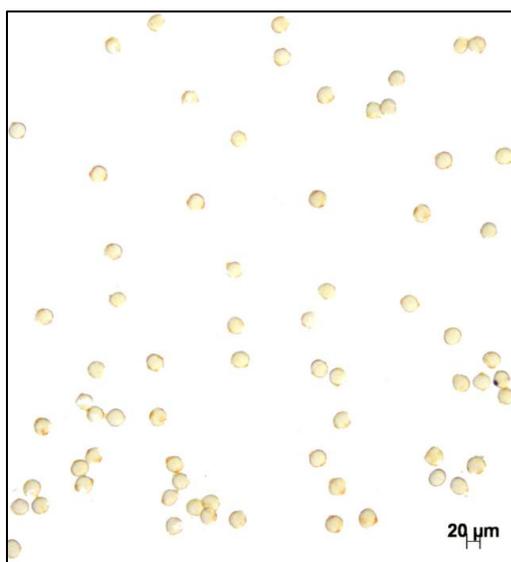


Fig. 13 : Grain de pollen de *Cistus* sp. (R. Moerman)



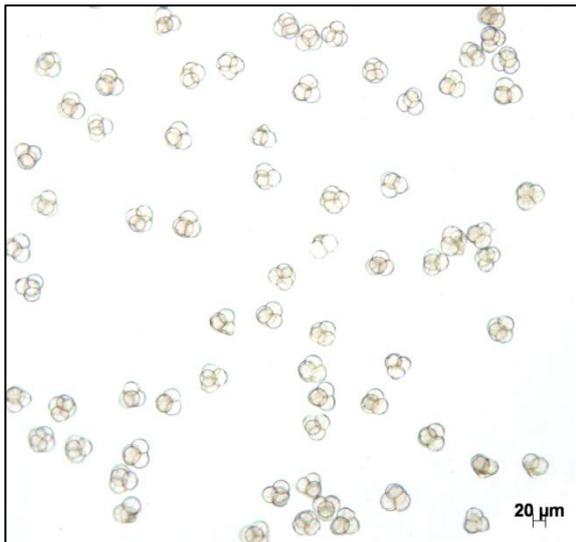
Fig. 14 : *Cistus crispus* (fr.gardening.eu)

### *Calluna vulgaris* (L.) Hull

*Calluna vulgaris* (fig. 15 et 16), ou callune, est un sous-arbrisseau mellifère de 30 cm à 1 m, de feuilles opposées. La callune est la seule Ericaceae du genre *Calluna*. On la trouve dans les landes, bois et coteaux arides des terrains siliceux (Coste, 1990).

Le pollen de callune est, avec les pollens de châtaignier européen et de genêt à balais, un pollen dominant dans certaines zones comme en Suisse. Il est considéré comme un pollen abondamment collecté (Keller *et al.*, 2004). *Calluna vulgaris* est une des principales ressources pour certains bourdons à langue courte comme *B. magnus* et *B. jonellus* (Waters *et al.*, 2011). De plus, certaines abeilles solitaires sur liste rouge, sont spécialisées sur *Calluna vulgaris* et dépendent donc fortement de cette ressource (Exeler *et al.*, 2010).

Il n'y a pas de contenu protéique référencé.



**Figure 15** : Pollen de *Calluna vulgaris* (R. Moerman)



**Figure 16** : Plante de *Calluna vulgaris* ([www.types-of-flowers.org](http://www.types-of-flowers.org))

## 1.5. Le pollen

Le pollen est, avec le nectar qui fournit les hydrates de carbones, une ressource majeure pour bon nombre d’insectes. Il contient des éléments variés comme des graisses, des minéraux, de l’eau, des protéines et des vitamines. Nous insisterons ici sur les stérols, les protéines et les sucres qui sont des éléments essentiels au développement des abeilles et de leurs larves.

Les nutriments ne sont pas faciles d’accès dans un grain de pollen. La couche externe, appelée exine, résiste à la pourriture et à la digestion mais est perforée d’un à plusieurs pores de germination. La couche interne, l’intine, est composée de cellulose et de pectine, elle résiste aussi à la pourriture et à la digestion. Cependant, bon nombre d’animaux se nourrissent de grains de pollen. Il existe 6 stratégies pour extraire le contenu du grain de pollen (Roulston & Cane, 2000) : (i) rompre mécaniquement le manteau du grain de pollen, (ii) percer le manteau du grain de pollen avec des zones tranchantes de la cavité buccale, (iii) dissoudre le manteau pollinique avec des enzymes et (iv) induire la germination ou la pseudo-germination, (v) éclater le grain par un choc osmotique, (vi) pénétrer le grain de pollen avec des enzymes digestives. L’hypothèse la plus retenue pour les abeilles est le choc osmotique au cours du passage entre le jabot et le ventricule se trouvant à des pressions osmotiques différentes (Kroon *et al.*, 1974).

### 1.5.1. Les stérols

Les stérols sont des stéroïdes (dérivés de cyclopento-perhydro-phénanthrène) portant un hydroxyle en C3 et une chaîne aliphatique de 8 à 10 carbones en C17 (Berthet, 2006), (fig. 17).

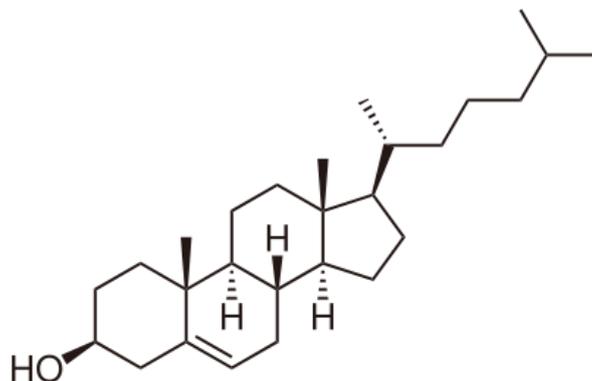
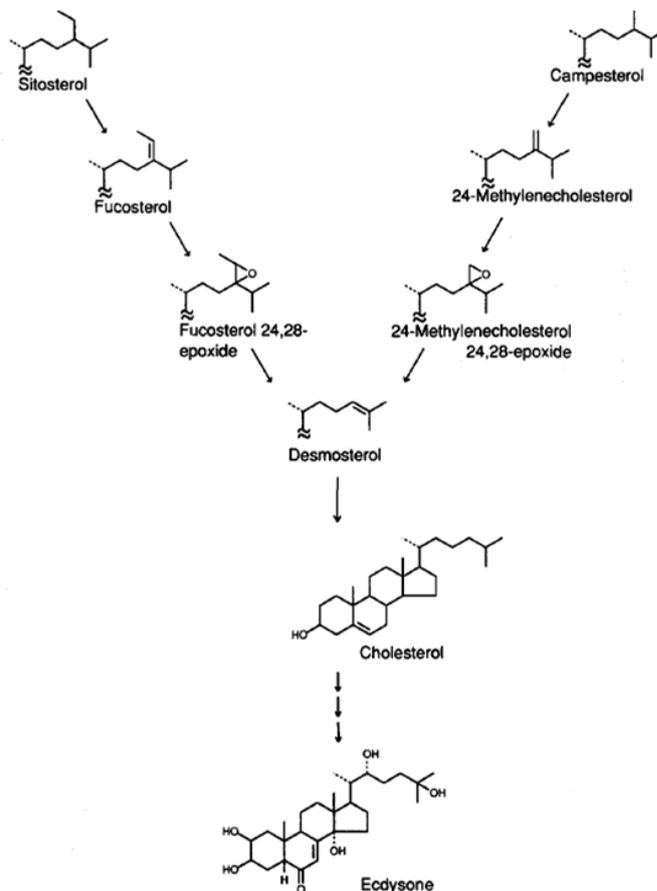


Figure. 17. Molécule de cholestérol (firetown.com)

Nous savons que les stérols ont 3 fonctions chez les animaux : (i) précurseurs d'autres stéroïdes, (ii) hormones et (iii) composés membranaires (Heftmann, 1970).

Hobson (1935a) est le premier à mettre en avant que les insectes utilisent des stérols dans leur alimentation. Contrairement aux humains qui peuvent synthétiser des stérols, les insectes ont besoin de les acquérir de manière exogène chez les plantes. La connaissance de cette carence est acquise depuis longtemps (Clark & Bloch, 1959).

Il est facile pour les insectes prédateurs de collecter une quantité suffisante de cholestérol via leurs proies. Le problème est tout autre pour ceux collectant des matières végétales pauvres en cholestérol comme le pollen. Ces éléments végétaux possèdent néanmoins des phytostérols utilisables par les insectes après transformation. En effet, il est possible pour certains insectes de convertir des phytostérols C28 et C29 en cholestérol via des voies métaboliques (Svoboda & Fedlauffer, 1991). Le point de départ de la conversion des stérols en cholestérol est souvent le sitostérol ou le campestérol (fig. 18).



**Figure 18** : schéma général de la désalkylation et de la conversion du sitostérol et du campestérol en cholestérol chez les insectes (Svoboda & Feldlauffer, 1991).

L'*Apis mellifera* fait partie d'un groupe d'insectes incapable de désalkyler les phytostérols pour produire le cholestérol. On a découvert chez ces insectes, ainsi que chez certaines espèces d'hémiptères, qu'ils produisent la makistéron A comme hormone de mue au lieu de l'ecdysone ou d'un de ses dérivés (Feldlaufer *et al.*, 1985). Pour obtenir ce composé, l'abeille domestique utilise le 24-méthylènecholestérol (Feldlaufer & Svoboda, 1988).

Les stérols auraient aussi un effet attractif sur les pollinisateurs (Hügel, 1962). Cependant, un ajout de stérol sur une diète artificielle n'augmente pas l'attraction pour cette diète (Herbert, 1992 cité dans Roulston & Cane, 2000).

Selon Svoboda *et al.* (1980), les stérols les plus importants pour l'abeille domestique semblent être le cholestérol et le 24-méthylènecholestérol.

Rasmont *et al.* (2005) indiquent que les besoins en stérols de *Bombus terrestris* sont différents de ceux de l'*Apis mellifera*. Ils émettent aussi l'hypothèse du rôle particulier que pourrait jouer le  $\beta$ -sitostérol dans les stratégies de pollinisations des bourdons.

Regali (1996) indique que, chez *Bombus terrestris*, le stigmastérol augmente les performances zootechniques des colonies en diminuant la période d'émergence des progénitures. Elle montre aussi que *Bombus terrestris* est capable de s'adapter à la composition stérolique des ressources présentes en modulant la nature de ses hormones de mues, ce que l'*Apis mellifera* est incapable de faire.

### 1.5.2. Les protéines

Les protéines sont nécessaires pour le développement et la croissance des larves. Cependant, la quantité de protéines nécessaire pour élever une larve d'abeille ou de bourdon n'est pas encore connue de manière précise (Keller *et al.*, 2004). Les protéines sont aussi nécessaires pour la survie des ouvrières elles-mêmes (Smeets & Duchateau, 2003).

De Groot (1953) a étudié les besoins en protéines et acides aminés chez l'abeille à miel. Il a montré qu'elles ont besoin de 10 acides aminés essentiels à une concentration allant de 1% à 4,5 % des protéines digérées. Étant donné que l'abeille ne peut les synthétiser, elle doit les prélever dans sa nourriture. La concentration relative en acides aminés essentiels apparaît comme relativement stable et indépendante de l'origine florale du pollen (Szczesna, 2006).

Le taux de protéines par poids sec de pollen varie de 2,5% à 61 % (Buchmann, 1986). La concentration en protéines est cependant bien conservée au sein d'une même famille de plante, à l'exception des Fabaceae riches en espèces (Roulston *et al.*, 2000).

Il semble y avoir une corrélation positive entre le contenu en acides aminés essentiels et le contenu en protéines totales du pollen (Wille *et al.*, 1985 cité dans Keller *et al.*, 2004). Wille *et al.* (1985) ont aussi montré que le contenu en protéines du pollen collecté par l'abeille à miel variait considérablement dans le temps, du fait de la variation de l'origine botanique.

Le contenu en protéines, utilisé comme critère de qualité du pollen, pourrait avoir un impact important sur le butinage et éventuellement expliquer les préférences de l'abeille pour certains types de pollen (Keller *et al.*, 2004).

### 1.5.3. Les sucres

Lorsque les abeilles collectent le pollen, certaines espèces (dont le bourdon) le mélangent avec un peu de nectar avant de le mettre dans leur corbeille à pollen (Parker, 1926). L'ultra-structure du grain influence la collecte de pollen par l'abeille. En effet, de par la morphologie de ces grains, l'abeille doit y ajouter plus ou moins de sécrétions pour les agglomérer en pelotes (Vaissière & Vinson, 1994). Ces éléments influent sur la composition en sucres du pollen des pelotes d'abeille.

Il a été montré que la composition en sucre du pollen varie selon : (i) l'origine végétale du pollen, (ii) la méthode de collecte et (iii) la méthode de stockage (Szczesna *et al.*, 1995a cité dans Szczesna *et al.*, 2002).

Au total, 14 sucres différents ont été identifiés dans le pollen dont le fructose, le glucose et le sucrose qui sont les plus importants en termes de quantité (Szczesna *et al.*, 2002). Des valeurs de 46 % pour le fructose, de 37 % pour le glucose et de 8% pour le sucrose ont été observées sur différents pollens par Szczesna (2007). Les autres sucres comme l'arabinose, le ribose, le tréhalose, l'isomaltose, le turanose, le coibiose, le gentiobiose, le melibiose et le melezitose ont des valeurs relatives proches de 1 % (Serra Bonvehi *et al.*, 1986). Le pollen contient aussi de l'amidon en quantité variable, de 12,4 % à 26 % (Stanley & Linskens, 1974). La présence d'amidon est très peu considérée dans les discussions abordant la composition des sucres dans les pelotes de pollen (Szczesna *et al.*, 2002).

## 2. MATERIEL ET METHODE

### 2.1. Collecte du pollen

Certains pollens nécessaires à notre étude ne sont pas disponibles via les fournisseurs. Ainsi, nous avons collecté nous-mêmes les pollens de *Sorbus aucuparia* et *Cytisus scoparius*. Il a également été possible de collecter par nos soins le pollen de *Salix caprea*. Les pelotes d'*Apis* (possibles à collecter en grande quantité) seront utilisées pour l'élevage des microcolonies. A titre comparatif, des pelotes de bourdons ont été prélevées manuellement sur certaines ressources.

#### 2.1.1. Pollen non disponible dans le commerce

Pour réaliser le test d'élevage, les analyses stéroliques et protéiques, il est nécessaire de collecter le pollen des différentes espèces végétales en question. Le pollen provient des récoltes d'une ruche d'abeilles mellifères (*Apis mellifera*). Celle-ci est placée dans une serre en présence successive des plantes dont on souhaite collecter le pollen. Pour cela, la ruche est munie d'une trappe à pollen qui permet de collecter les pelotes des pattes des abeilles dans un tiroir prévu à cet effet. Lorsque cela a été possible, nous avons collecté à la fois des pelotes de *Bombus* et d'*Apis* sur les mêmes ressources. L'analyse comparée des pelotes nous permettra, ou non, d'extrapoler les performances de microcolonies élevées avec du pollen d'*Apis* ou bien de *Bombus*.

La trappe à pollen existe sous de nombreuses formes mais toutes ont toujours deux éléments basiques que sont la grille qui retient le pollen des pattes, et un tiroir pour récupérer le pollen (Detroy & Harp 2009). La trappe utilisée pour nos prélèvements est placée en position basse (fig. 19 et 20).



Figure 19 et 20 : ruche équipée d'une trappe à pollen en position basse (R. moerman)

Les plantes sont présentées sous forme de bouquets (fig. 21) et remplacées tous les 2 jours. Avec cette technique, nous espérons récolter environ 100 g (poids sec) par jour comme cela a été observé dans une étude précédente (Lavie, 1963). Notons que ce résultat de 100g/jour rejoint l'idée de Tautz (2009) qui cite le chiffre de 30 kg/an de pollen récolté pour une colonie d'importance moyenne. Les collectes ont montré des résultats plus faibles avec une moyenne de 25g/jour. Cette valeur varie en fonction de la température journalière.



**Figure 21** : Bouquets de saule placés en serre avec les *A. mellifera* (R. Moerman)

Pour compléter nos collectes de pollen de genêt, nous avons placé la ruche sur une station extérieure (fig. 22). Chaque soir, le pollen est ramassé, trié et stocké au congélateur (-20°C). Après une semaine, nous avons obtenu la quantité de pollen souhaitée. Durant cette période, nous avons vérifié si les abeilles collectaient majoritairement sur le genêt. Une fois le pollen collecté, l'origine des pelotes est vérifiée par observation microscopique.



**Figure 22** : Collecte du pollen de *C. scoparius*, ici en Hautes Ardennes (R. Moerman)

Notre volonté était, au départ, de collecter, via les *Apis*, du pollen de *Vaccinium uliginosum* en plus des pollens de genêt, sorbier et saule. En effet, cette plante est emblématique du Plateau des Tailles qui a servi de cadre géographique à notre étude. Lors de la tentative sous serre, les *Apis* n'ont montré aucun intérêt pour cette plante. Nous avons tenté de collecter du pollen d'une espèce proche, *Vaccinium myrtillus*. A nouveau, aucune pelote d'*Apis* n'a pu être collectée. Cela peut

s’expliquer par les observations de Pouvreau (2004) qui indiquent la capacité de l’abeille à miel à détecter les odeurs de fleurs, excepté celle de myrtilles qu’elle ne perçoit pas. Il est à noter que Rasmont *et al.* (2005) observaient aussi que *Apis mellifera* ne collecte pas de pollen d’*Arbutus unedo*, une autre Ericaceae à fleurs urcéolées. Quelques pelotes de bourdons ont cependant pu être collectées pour analyse.

### 2.1.1. Le pollen commercial

Les pollens de ciste et de callune sont obtenus à partir de pollen commercial de la marque *Pollenergie*. Les firmes qui vendent du pollen frais-congelé utilisent aussi *A. mellifera* pour collecter le pollen. Afin d’isoler, dans ces pollens multif floraux, les pelotes de ciste et de callune, les grains de pollen des pelotes sont identifiés au microscope. Généralement, les couleurs des pelotes varient en fonction de leur composition en pollen. Une fois la couleur associée au bon pollen, le tri peut se faire manuellement sur base de la couleur uniquement. Un échantillon monofloral est ainsi constitué. Cette méthode peut être appliquée sur des pelotes d’abeille domestique qui montrent une constance notable quant au choix du pollen collecté (Free, 1963 cités par Keller *et al.*, 2004).

L’ensemble des quantités collectées sont résumées dans le tableau 1.

**Tableau 1** : quantités de pollen collectées. Certains échantillons n’ont pas pu être collectés (N.P.).

Plantes	Pollen de <i>Bombus terrestris</i> (mg)	Pollen d’ <i>Apis mellifera</i> (g)
<i>Calluna vulgaris</i> L.	N.P.	A volonté (commercial)
<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	131	108
<i>Salix caprea</i> L.	505	263
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	200	107
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	173	N.P.
<i>Vaccinium uliginosum</i> L.	N.P.	N.P.
<i>Cistus</i> sp.	N.P.	A volonté (commercial)

## 2.2. Stockage du pollen

Le pollen destiné à l’analyse protéique, stérolique et des sucres est lyophilisé. Pour ce faire, le pollen est placé dans des tubes Falcon de 50 ml. Les tubes sont ensuite placés 45 minutes à -80°C avant d’être placés une journée au lyophilisateur. Les tubes sont perforés avant la manipulation pour permettre à l’eau de s’évacuer. Une fois l’eau sublimée, les tubes sont récupérés et entourés de parafilm avant d’être

stockés au congélateur (-40°C) en attendant les analyses. Le pollen destiné à l'élevage est lui stocké à -20°C sans lyophilisation préalable.

La différence de masse avant et après lyophilisation permet d'évaluer le pourcentage d'eau présent dans le pollen. Ces résultats sont présentés en annexe 22.

### 2.3. Préparation du pollen destiné à nourrir les bourdons

Le pollen est broyé à l'aide d'un mortier et mélangé avec du sirop (Biogluc pink ®) pour obtenir une pâte malléable (voir annexe 23 à 25). Le résultat obtenu forme un candi de pollen qui sera stocké au congélateur jusqu'à utilisation. Tous les 2 jours un morceau de candi de 0,5 à 1 g est pesé et placé dans chaque microcolonie.

### 2.4. Microcolonie et élevage

Pour cette étude, nous n'utilisons pas de colonies entières de bourdons. Seules quelques ouvrières sont isolées de la reine et du reste de la colonie, on parle alors de microcolonie. Dans notre protocole, 4 jeunes ouvrières sont isolées dans des cages en plastiques transparentes de 16 x 16 x 10 cm (fig.23). Le sirop (Biogluc yellow ®) est stocké dans un réservoir sous la cage et amené par capillarité aux ouvrières. Le sirop est fourni *ad libitum*. La quantité de sirop consommée est obtenue en réalisant la différence entre le niveau au début du test (110 ml) et celui à la fin. Les microcolonies sont placées dans une salle climatisée où la température (29°C) et le taux d'humidité (65%) sont maintenus pour assurer leur bon développement.



Figure 23 : Microcolonie de *Bombus terrestris terrestris* (R. Moerman)

Le protocole d'élevage se base sur l'étude de Tasei & Aupinel (2008). Ils réalisent un test alimentaire avec des microcolonies de bourdons qui s'étale sur une période de 14 jours après la ponte. Les paramètres pris en compte lors de cette étude sont :

- ✓ Le poids des larves/ $\mu$ colonies
- ✓ Le poids moyen d'une larve
- ✓ Le nombre de larves vivantes/ $\mu$ colonie
- ✓ La consommation de pollen 5 jours avant la ponte/ $\mu$ colonie
- ✓ La consommation de pollen 14 jours après la ponte/ $\mu$ colonie
- ✓ Le pourcentage de larves éjectées/ $\mu$ colonie
- ✓ La mortalité des ouvrières (%)
- ✓ L'oophagie
- ✓ L'efficacité du pollen (poids des larves/consommation pollen après la ponte)

Lors de notre test, nous avons décidé de supprimer l'oophagie non significative lors du test des auteurs et difficile à observer. Nous avons ajouté la consommation de sirop pour la période de manipulation comme paramètre supplémentaire. Cette mesure a été réalisée lors d'un test d'élevage récent (Roelandts, 2010). Nous avons également réduit la période après la ponte à 12 jours. Cela est suffisant pour le développement des larves qui sont alors isolées les unes des autres et plus faciles à comptabiliser et à peser.

Pour les trois premiers critères, les larves sont comptées et pesées 12 jours après la ponte. Seules les larves ayant atteint un stade individuel sont prises en compte.

La consommation de pollen est obtenue grâce aux mesures effectuées lors de la pesée des différents candis. En effet, le candi est pesé avant son placement dans la microcolonie et ce qu'il en reste est pesé 2 jours plus tard. On ajoute ensuite un nouveau candi dans la microcolonie.

Enfin, chaque jour à partir de la ponte, le nombre de larves éjectées est compté pour chaque microcolonie et les larves mortes retirées des cages.

## 2.5. Combinaisons alimentaires

Différentes combinaisons alimentaires ont été utilisées dans cette étude (tab. 2). Ces dernières ont été mises à la disposition des microcolonies (7 par combinaison alimentaire) comme montré à la figure 24. Nous avons ainsi pu mesurer chacun des paramètres cités précédemment.

**Tableau 2** : Combinaisons alimentaires utilisées lors de ce travail

Combinaisons alimentaires	Code utilisé
Ciste (témoin -)	A
Saule (témoin +)	B
Genêt	C
Sorbier	D
Callune	E
Genêt + sorbier	F
Genêt + callune	G
Callune + sorbier	H
Callune + sorbier + genêt	I



**Figure. 24** : Salle d'élevage avec les microcolonies de bourdons (R. Moerman)

## 2.6. Analyse des stérols

Les analyses micro-quantitatives de stérols se basent sur la méthode adaptée de Lognay *et al.* (1989, 1992) et mise au point par Vanderplanck *et al.* (2011). Les détails reprenant les caractéristiques du matériel d'analyse sont précisés dans le précédent article et ne sont pas repris ici. L'ensemble des analyses a été réalisé dans le laboratoire de chimie analytique du Prof. G. Lognay, à la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux.

La première étape est une pesée des échantillons lyophilisés. Les analyses antérieures montrent qu'il faut au minimum 20 mg d'échantillon et une répétition de trois échantillons pour chaque pollen analysé.

Du KOH méthanolique est ensuite ajouté et l'échantillon est placé à 80°C (bain-marie) pour que la saponification se réalise. En effet, les stérols se retrouvent dans la partie insaponifiable de l'échantillon. Une quantité de bétuline de concentration connue est alors ajoutée. Cet ajout d'un standard interne permettra d'estimer la concentration des différents stérols vis-à-vis de ce composé.

L'étape suivante est une extraction de la partie insaponifiable à l'aide d'un solvant étheré. L'extrait est rincé plusieurs fois à l'eau milli Q.

La manipulation se poursuit par une chromatographie sur couche mince (CCM). Le solvant des échantillons étherés est évaporé avant de remettre l'échantillon en solution par du chloroforme. Les solutions sont ensuite étalées uniformément sur plaque de silice à l'aide d'une seringue. Cette étape terminée, des spots de référence (mélange de bétuline et de cholestérol à haute concentration) sont déposés de part et d'autre de l'échantillon (en utilisant un capillaire), avant de placer la plaque dans l'éluant pour migration. L'éluant est un mélange de chloroforme, éther diéthylique et ammoniac 90 :10 :0.5 (v, v, v).

Après migration, les plaques subissent une vaporisation d'une solution de 2',7'-dichlorofluorocéine et sont révélées sous U.V. (254 nm). La zone de la plaque correspondant aux stérols est grattée et la silice récupérée dans des tubes à essai. Du chloroforme est ajouté à cette silice pour remettre en solution les stérols qui seront purifiés après évaporation sous azote du solvant.

La dernière étape est une silylation. Pour ce faire, de la pyridine anhydre (solvant) et un réactif de silylation (SILYL-991) sont ajoutés. La réaction se déroule à

90°C dans un bain-marie. Enfin, l'échantillon est à nouveau évaporé sous azote et remis en solution par 200µl de n-hexane.

Les échantillons sont ensuite préparés pour une chromatographie en phase gazeuse (CPG). La détection des stérols se fait sur base de leurs temps de rétention relatifs comparés à ceux d'une étude précédente (Vanderplanck, 2009).

La partie analytique se termine par l'obtention des chromatogrammes. Ces derniers sont analysés en utilisant le logiciel *ChromCard*. Nous obtenons ainsi les différentes aires de chacun des pics, résultant de l'intégration. Plusieurs formules sont alors utilisées :

- ❖ Pour calculer la quantité (mg) de stérols suivant la quantité de pollen frais pesé avant analyse (g) :

$$\frac{[(\text{Aire du pic X} / \text{aire du pic de bétuline}) * (\text{concentration en ISTD [mg/ml]})]}{\text{Poids de l'échantillon (g)}}$$

- ❖ Pour calculer le pourcentage relatif des différents stérols :

$$\frac{(\text{Aire du stérol})}{(\text{Aire de l'ensemble des stérols})} \times 100$$

Les aires des stérols sont exprimées en [.1\*uv\*sec]

## 2.7. Analyse des protéines

La méthode la plus utilisée pour doser les protéines totales présentes dans le pollen est le micro-Kjeldahl (Sadasivan & Manickam, 1996). Cette technique permet de doser la quantité d'azote totale présente dans des échantillons de nature variable. L'azote est un des éléments majeurs, après le carbone, l'hydrogène et l'oxygène, trouvé dans les molécules du vivant. L'azote est présent dans les acides aminés, les bases azotées, les vitamines etc. Cependant, les protéines constituent la source principale d'azote. Dans beaucoup de protéines, l'azote constitue 16 % de la composition totale. Le contenu total d'azote détecté par l'analyse est multiplié par 6,25 pour arriver à une valeur approximative du taux de protéine.

Le principe est de convertir l'azote en sulfate d'ammonium lors d'une digestion à l'acide sulfurique. L'ammoniac est ensuite isolé par distillation. Ce dernier, alors sous forme de vapeur, est piégé par de l'acide borique. L'ammoniac ainsi piégé est quantifié par dosage acide-base.

Rabie *et al.* (1983) indiquent qu'il y a actuellement des variations dans la valeur du facteur de conversion du taux d'azote en taux de protéine chez les plantes. Ils recommandent d'utiliser un facteur de conversion de 5,6 plutôt que 6,5. Etant donné que le second facteur multiplicatif est le plus communément utilisé dans la littérature pour les protéines de pollen, il est toujours favorisé (Buchmann, 1986 cité par Roulston *et al.*, 2000).

Une autre méthode communément employée est le Bradford. Cette méthode utilise une assez grande quantité de pollen pour l'analyse. Il est aussi nécessaire d'utiliser une protéine de nature similaire à celles présentes dans l'échantillon pour réaliser une courbe de calibration fiable. Les inconvénients principaux de la méthode sont donc : un besoin important de pollen et une connaissance préalable des protéines de l'échantillon.

Pour minimiser la quantité de pollen nécessaire à la manipulation et le temps d'expérimentation, nous avons utilisé une autre méthode.

L'objectif est ici de déterminer la concentration protéique des échantillons de pollen utilisés. La quantification des protéines nécessite une mise en solution, ce qui n'est pas simple avec des échantillons polliniques. Comme indiqué préalablement, le grain de pollen possède une structure périphérique très résistante constituée de l'exine et de l'intine.

Pour libérer le contenu protéique, nous avons utilisé une méthode originale où un choc mécanique est utilisé. Les grains de pollen, en présence d'une solution tampon [Tris-HCl 25mM pH 7,5 ; EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), cocktail d'inhibiteur de protéases] sont éclatés par un double passage à la *french-press* qui exerce une forte pression sur l'échantillon.

Un échantillon est constitué au minimum de 5 mg (valeur fixée après plusieurs essais) de pollen auxquels sont ajoutés 500 µl de solution tampon. L'ensemble, placé dans un tube Eppendorf, est vortexé jusqu'à obtenir un mélange homogène. L'échantillon est laissé 1h au congélateur à -80°C.

Après avoir laissé décongeler, les échantillons sont placés 2 min au sonicateur (bain à ultra-sons) avant un passage à l'ultracentrifugeuse (25 000 rpm, 4°C, 25 min.).

Le surnageant est ensuite récupéré délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur et conservé sur glace pour la quantification. Une fraction du culot peut être prélevée et placée entre lame et lamelle afin de vérifier l'efficacité de l'extraction (éclatement des grains de pollen).

Le surnageant récolté est constitué de protéines mais aussi d'autres composés comme des lipides, des sucres et les composés utilisés dans le tampon (Tris et EDTA). Il est donc nécessaire d'éliminer tout ce qui n'est pas protéique ; c'est ce que permet de faire le kit de quantification utilisé : *Non-Interfering™ Protein Assay*.

Le protocole d'utilisation du kit est divisé en 2 étapes. L'ensemble se réalise dans des Eppendorfs de 2 ml.

La première étape consiste à prélever 50 µl de chacun des surnageants de nos échantillons. C'est à ce moment que s'effectue aussi les prélèvements de BSA (albumine sérique bovine) de concentration croissante (0, 8, 16, 24, 40, 50 µg) qui seront utilisés pour tracer la droite de calibration. On y ajoute un agent universel de précipitation protéique (UPPA). 500 µl d'UPPA-I sont ajoutés simultanément dans chaque tube. Ces derniers sont vortexés et laissés à température ambiante quelques minutes. De l'UPPA-II est ensuite ajouté, avant un nouveau passage au vortex. Les tubes sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 10.000 g. Après cette centrifugation, les protéines sont fixées contre les parois alors que les composés de natures différentes sont en solution dans le surnageant. Le surnageant est donc éliminé avant de laisser sécher les tubes à température ambiante.

La seconde étape est celle de la quantification proprement dite. On ajoute 100 µl d'un réactif (I) alcalin de concentration en cuivre connue et 400 µl d'eau milli Q. Pour remettre en solution les protéines, les tubes sont vortexés. Les ions de cuivre se fixent alors au niveau des liens peptidiques. On utilise ensuite 1000 µl d'un réactif (II) colorant qui va permettre de révéler les ions de cuivre non fixés qui pourront être quantifiés. L'intensité de la couleur sera, par conséquent, inversement proportionnelle à la teneur en protéines. Les tubes sont "vortexés" une dernière fois avant d'être laissés 25 min à température ambiante. Enfin, l'absorbance est lue à 480 nm.

La courbe de calibration est obtenue grâce aux valeurs des échantillons de BSA de concentrations connues. Les concentrations protéiques des pollens étudiés sont déterminées par croisement entre l'absorbance observée et l'équation de la courbe.

Les différentes analyses sont réalisées dans le service de protéomique et de microbiologie du Prof. R. Wattiez, à L'Université de Mons.

## 2.8. Analyse des sucres

Les analyses de sucres sont réalisées à l'INRA d'Avignon, Laboratoire de Pollinisation et Ecologie des Abeilles, en collaboration avec le Dr. S. Suchail. La technique utilisée est une analyse en HPIC, c'est-à-dire une chromatographie ionique de haute performance. Cette analyse permet d'identifier les sucres présents à la surface de la pelote de pollen.

Une quantité minimale de 10 mg de pollen est nécessaire pour l'analyse. Une fois le pollen pesé, on y ajoute de l'eau ultra pure. Cette caractéristique de l'eau permet de s'assurer de l'absence d'ions étrangers à l'échantillon pouvant réagir avec la cathode au cours de la chromatographie ionique.

La quantité d'eau ajoutée est variable, plusieurs tests sont nécessaires pour s'assurer de la bonne dilution de l'échantillon. Dans notre cas, 1200 µl sont utilisés. Le tube Eppendorf contenant le mélange eau-pollen est ensuite vortexé jusqu'à l'obtention d'une solution homogène.

L'échantillon ainsi préparé ne peut pas être directement analysé. En effet, de nombreuses impuretés sont encore présentes dans la solution et risqueraient de boucher la colonne de l'HPIC. Il est donc nécessaire de filtrer l'échantillon à l'aide d'un filtre millipore (*IC Millex*® - LG 0,2µl) adapté sur une seringue. L'échantillon ainsi filtré est prêt pour la chromatographie.

Le résultat obtenu est un chromatogramme dont les valeurs sont exprimées en nano-moles (nmoles). Chaque pic apparaît à un temps de rétention qui est propre à un sucre bien particulier. Seuls les sucres préalablement calibrés par le service de l'INRA seront étudiés. Il s'agit des sucres les plus communs dans les échantillons de pollen (fig. 25).

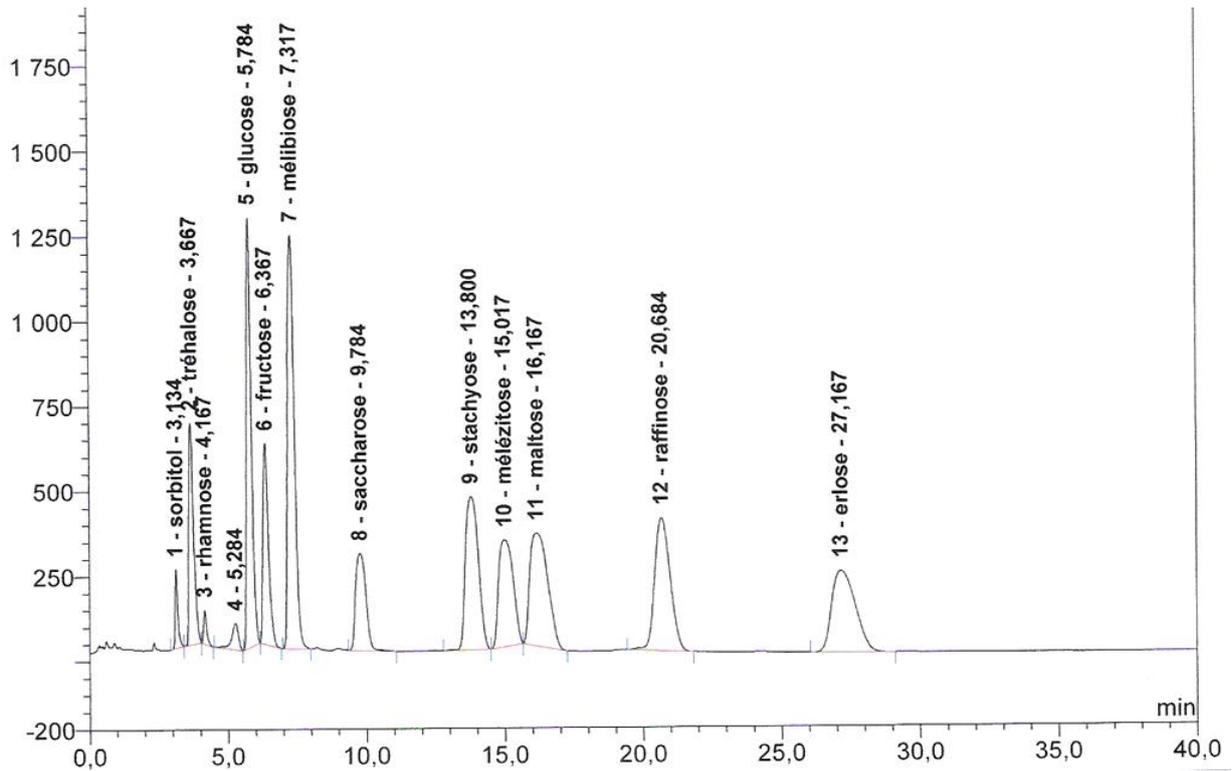


Figure 25 : Chromatogramme reprenant les différents sucres considérés (S. Suchail)

## 2.9. Analyses statistiques

Pour ce travail nous avons utilisé 2 types de tests statistiques : (i) ANOVA et (ii) Kruskal-Wallis. Le seuil alpha considéré pour ces tests est de 5%. Nous utilisons aussi deux méthodes d'ordination : une analyse en composantes principales (ACP) et un dendrogramme.

Les résultats du test d'élevage ont été traités avec l'ANOVA. L'hypothèse particulière  $H_0$  est que la nature du pollen n'influence pas sur la masse des larves, la masse moyenne d'une larve, la mortalité des ouvrières, l'efficacité du pollen, la consommation de sirop, le nombre de larve, la consommation du pollen 5J avant la ponte, la consommation du pollen 12J après la ponte et le nombre de larve éjectée. Notons qu'avant d'utiliser ce test, nous avons veillé à ce que notre jeu de données présente les conditions d'application requises : échantillonnage aléatoire, indépendance, homoscedasticité (test de Bartlett,  $H_0$ : égalité des variances) et normalité de la distribution des résidus (QQ-plot). Dans le cas où l'une des conditions n'est pas rencontrée, nous travaillons avec l'équivalent non-paramétrique de l'ANOVA, le test de Kruskal-Wallis. Pour les analyses de stérol, nous utilisons les tests d'ordinations. Les résultats des stérols ont été analysés avec une ACP et ordonnés sous forme d'un dendrogramme.

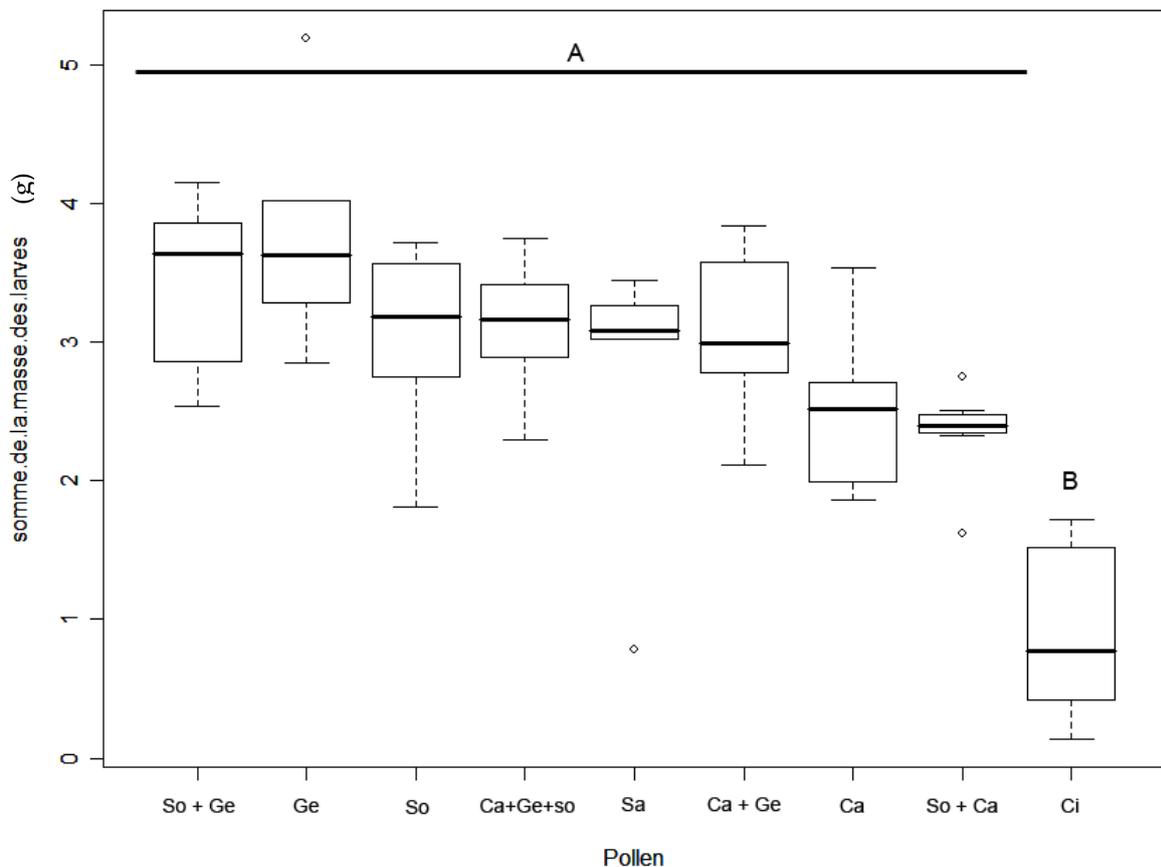
### 3. RESULTATS

#### 3.1. Développement des microcolonies

Les résultats obtenus lors de l'élevage des microcolonies sont présentés sous forme de boîtes de dispersions. Des lettres sont utilisées pour indiquer les différences obtenues à la suite d'un test d'analyse de la variance (ANOVA). Une comparaison multiple des moyennes complète ce test de manière à indiquer quelles sont précisément les combinaisons alimentaires qui diffèrent les unes des autres.

##### 3.1.1. Poids des larves par microcolonies

Les masses des larves sont significativement influencées par la nature de la ressource de pollen. La plus grosse quantité de larve (g) est obtenue avec le pollen de sorbier alors que la plus petite est obtenue avec des microcolonies nourries au pollen de ciste. Hormis entre le ciste d'une part et les autres combinaisons d'autre part, il n'y a pas de différences significatives entre les combinaisons (fig. 26).



**Figure 26 :** Distribution de la masse des larves suivant les combinaisons alimentaires : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.2. Poids moyen d'une larve

La nature du pollen a un impact significatif sur la masse moyenne d'une larve. Une alimentation composée exclusivement de pollen de ciste engendre des larves de masse significativement inférieure aux larves élevées avec d'autres pollens. Les plus grosses larves s'obtiennent avec une alimentation composée de pollen de sorbier. Cette différence est significative en comparaison avec les autres diètes, exceptée celle constituée du mélange des trois pollens, celle constituée de pollen de genêt pur et celle faite du mélange callune-genêt (fig. 27).

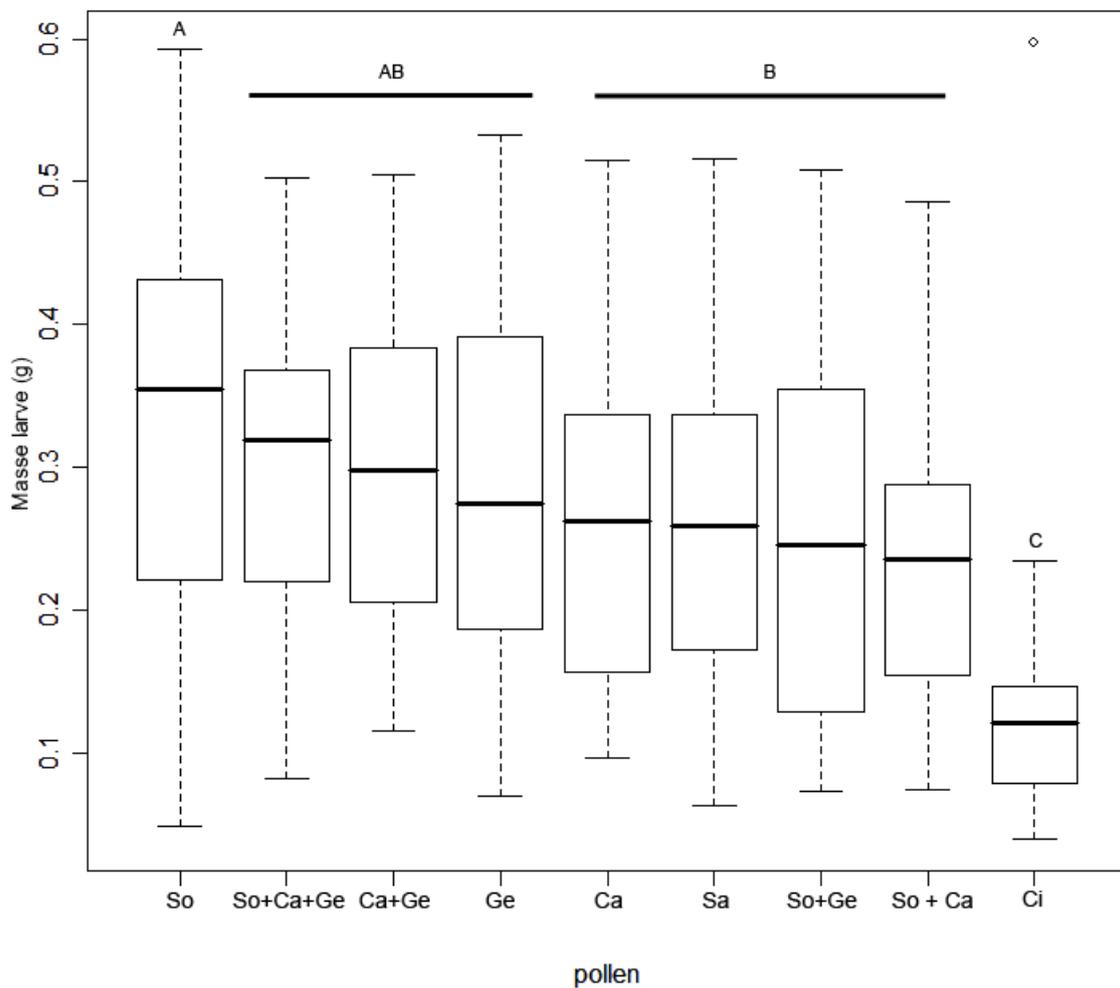
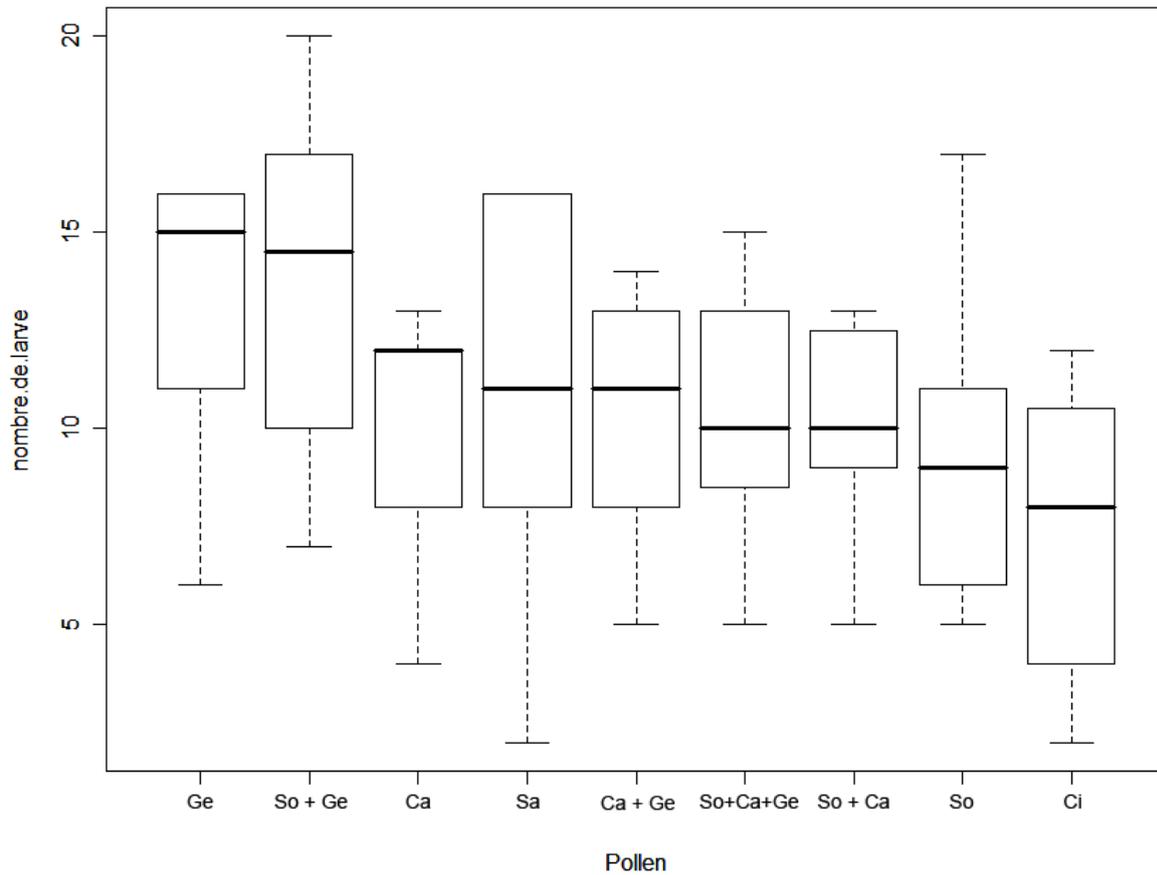


Fig. 27 : Distribution de la masse d'une larve suivant le type de nourriture : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.3. Nombre de larves vivantes par microcolonies

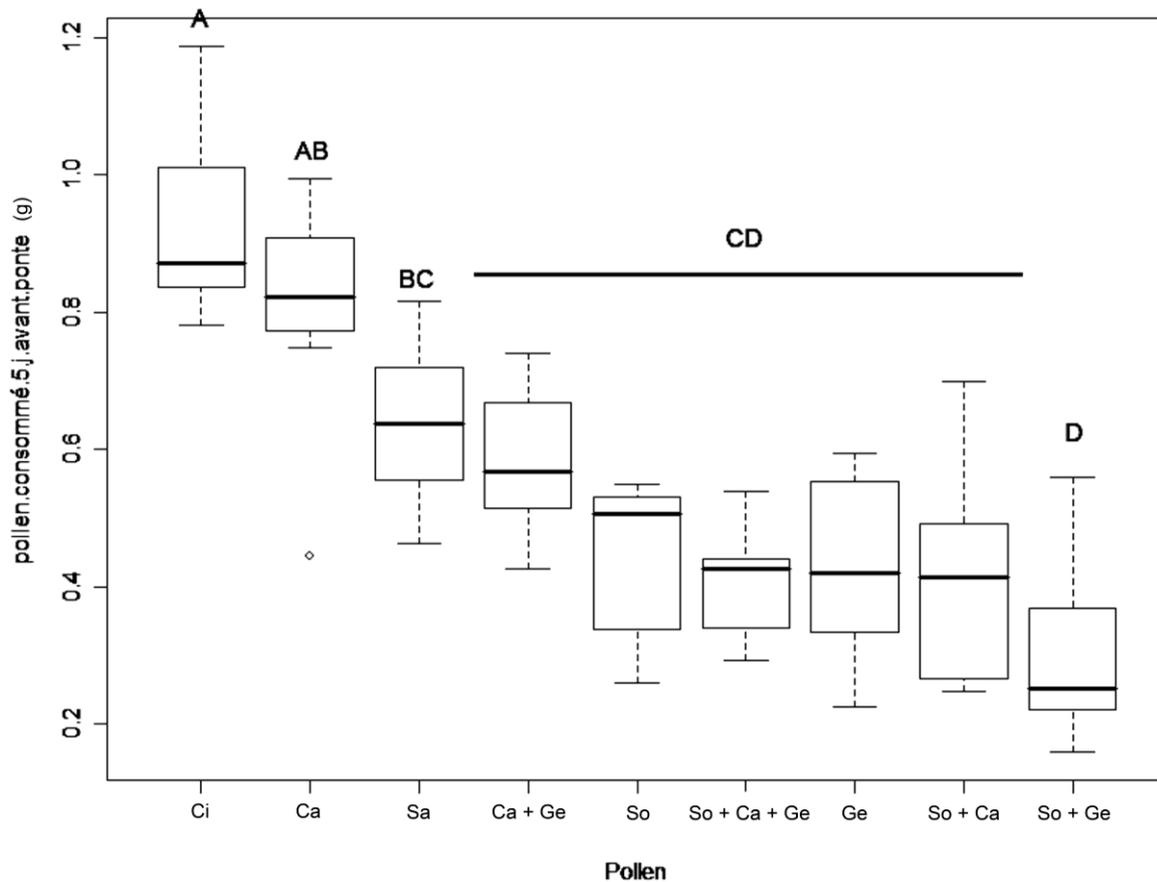
Aucune différence significative n'a été observée pour le nombre de larves vivantes par microcolonies (fig. 28).



**Figure 28 :** Distribution du nombre de larves obtenues par combinaisons alimentaires : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.4. Consommation de pollen 5 jours avant la ponte

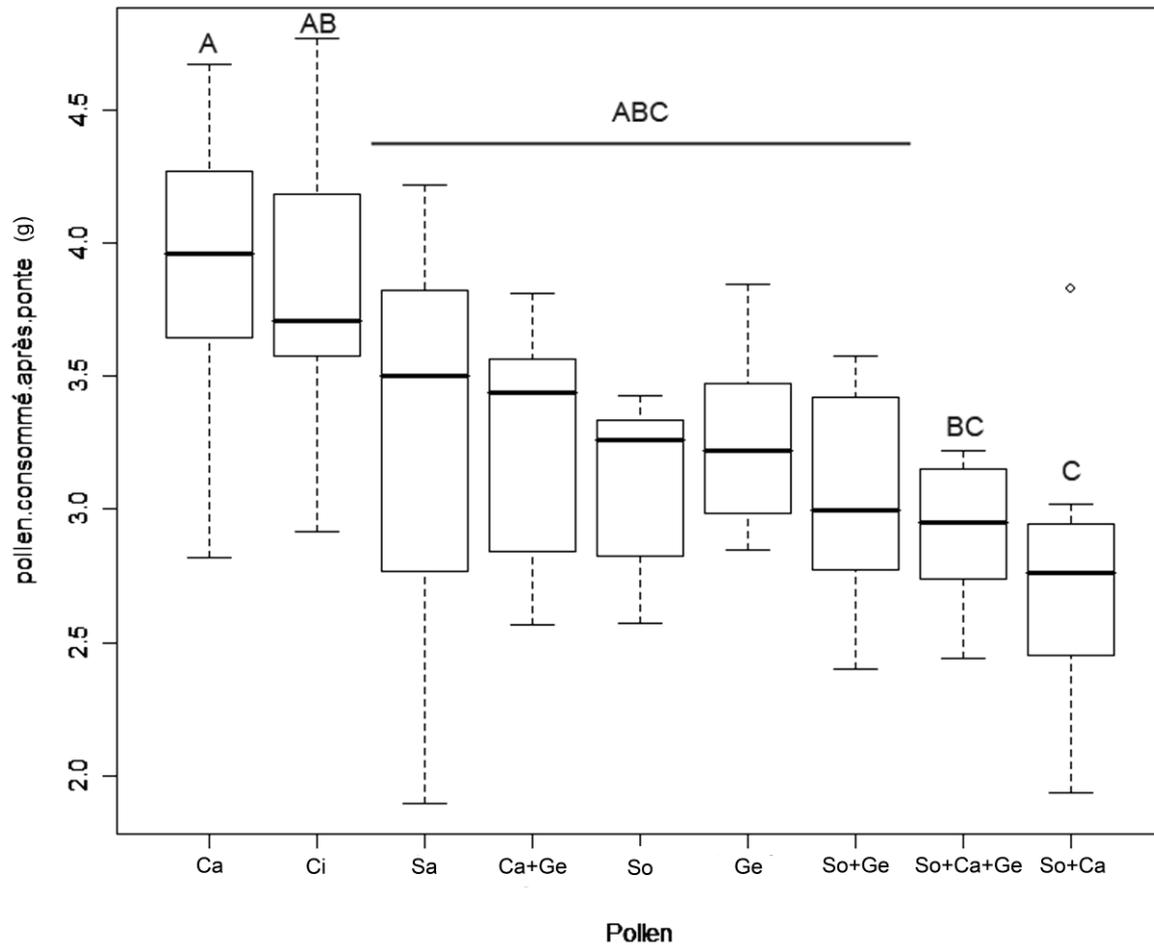
La composition du pollen a une influence significative sur les quantités consommées avant la ponte. Les pollens les plus consommés sont ceux de ciste et de callune sans différence significative entre eux. Les combinaisons de pollen les moins consommées sont celles faisant intervenir le sorbier et le genêt. Notons que la consommation du sorbier mélangé à la callune est significativement inférieure à la consommation de callune seule (fig. 29).



**Figure 29** : Distribution de la consommation du pollen 5 jours avant la ponte (g) suivant la source de nourriture : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.5. Consommation de pollen 12 jours après la ponte

Il y a un impact significatif de la ressource alimentaire sur la consommation après la ponte. Les pollens les plus consommés sont de nouveau les pollens de ciste et de callune. Les autres combinaisons ne sont pas distinguables les unes des autres (fig. 30).



**Figure 30 :** Résultat de la consommation de pollen après la ponte (g) suivant les variétés de pollens : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.6. Mortalité des ouvrières

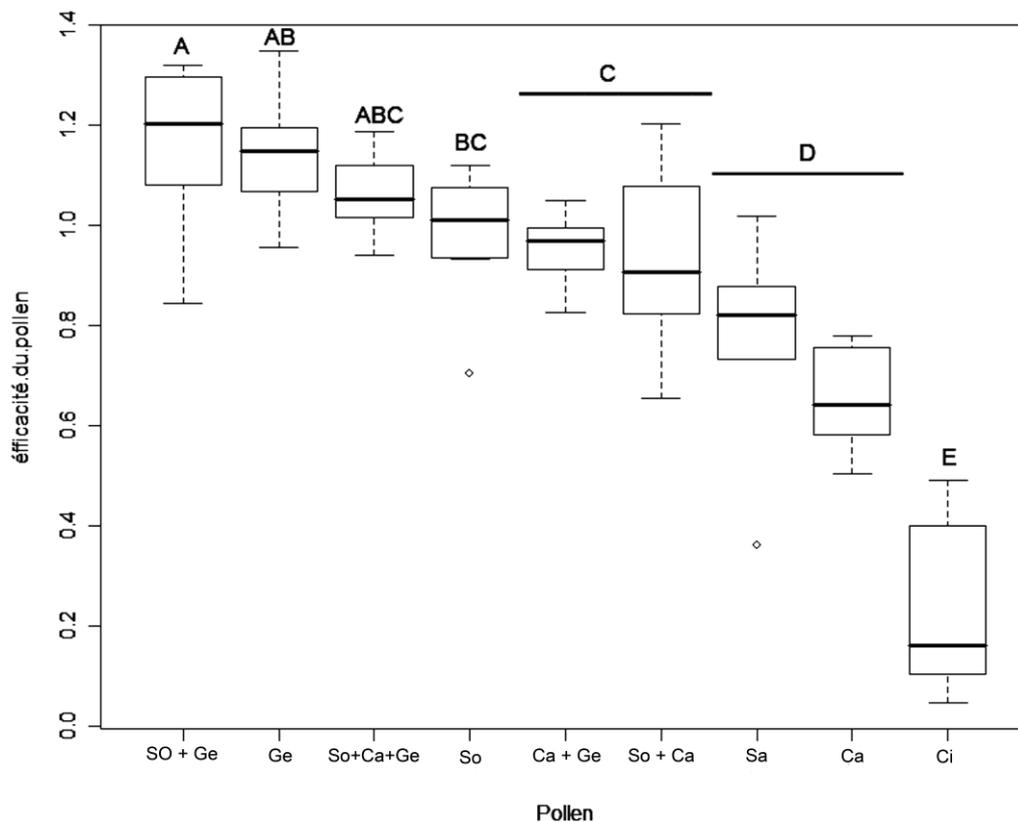
La mortalité des ouvrières est significativement influencée par la variété de pollen. Cependant, seules des microcolonies élevées en présence de pollen de genêt pur ont subi des pertes d'ouvrières.

### 3.1.7. Pourcentage du nombre de larves éjectées

L'origine pollinique n'a pas d'influence significative sur le pourcentage de larves éjectées.

### 3.1.8. Efficacité du pollen

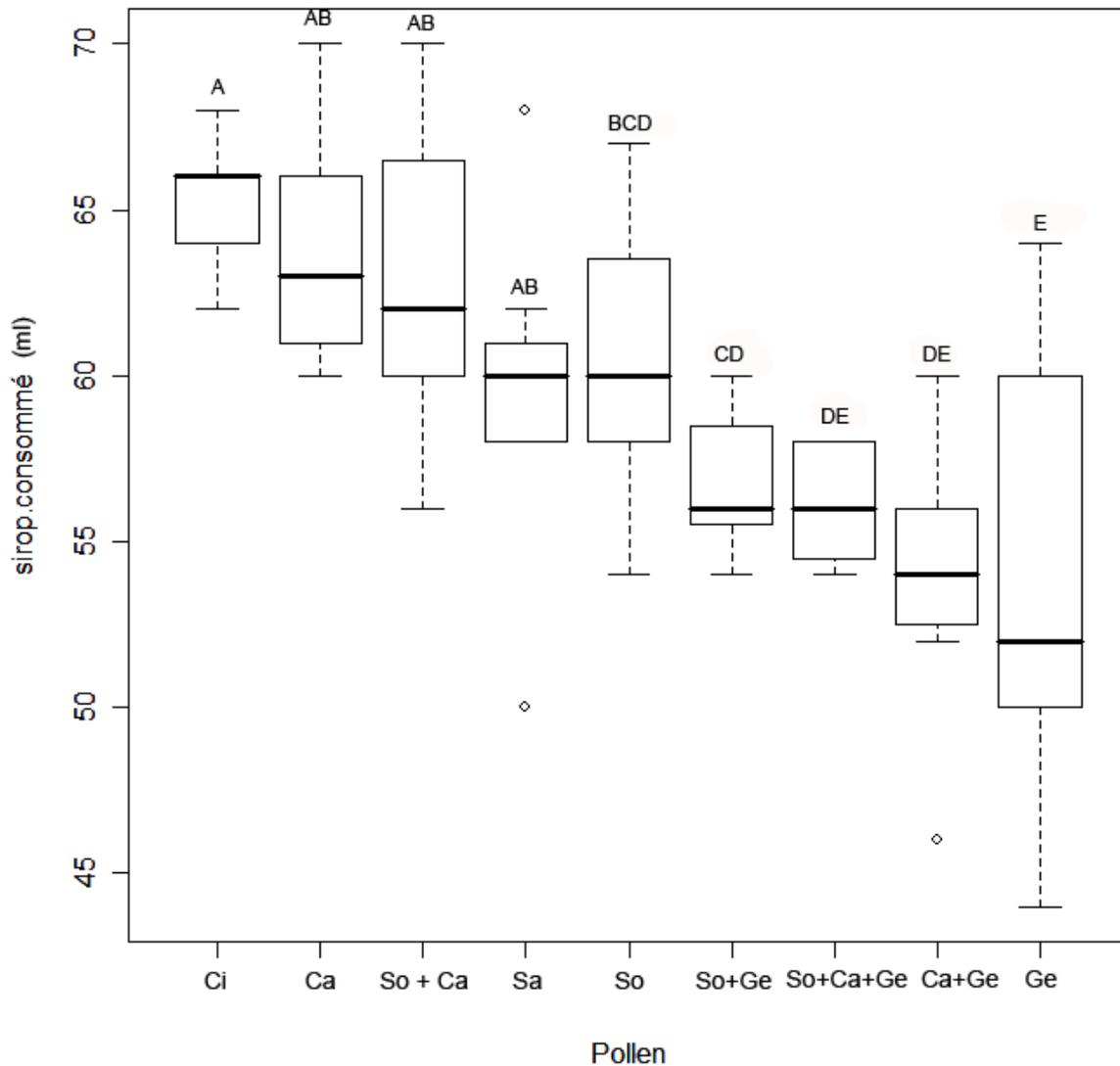
L'efficacité du pollen (poids des larves/consommation de pollen) est significativement différente selon l'origine botanique de ce dernier. Le pollen de ciste, le pollen de callune et de saule ont une efficacité significativement moindre que tous les autres. Il n'y a pas de différence significative entre l'efficacité des autres combinaisons alimentaires sauf pour le mélange sorbier-genêt qui se distingue de la majorité des autres combinaisons (fig. 31).



**Figure 31** : Résultat de l'efficacité du pollen suivant les variétés de pollens : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

### 3.1.9. Consommation de sirop

Le type de pollen utilisé pour la diète influe significativement sur la consommation de sirop par les bourdons. La consommation la plus importante est observée pour des microcolonies nourries avec du pollen de ciste ou de callune. Les bourdons élevés avec du pollen de genêt consomment le moins de sirop face à la majorité des autres diètes (fig. 32)



**Figure 32 :** Consommation de sirop suivant la source de pollen fournie : (So) sorbier, (Ge) genêt, (Ca) callune, (Sa) saule, (Ci) ciste.

Les résultats du test d'élevage indiquent clairement trois choses : (i) la mauvaise qualité nutritionnelle du pollen de ciste, (ii) la bonne qualité nutritionnelle des pollens de genêt et surtout de sorbier, (iii) qu'une diète constituée de callune est mauvaise pour le développement de colonies de *Bombus terrestris terrestris*.

## 3.2. Composition chimique des pelotes de pollen

### 3.2.1. Analyse des stérols

#### *Cytisus scoparius*

L'analyse de la composition stérolique du *Cytisus scoparius* révèle la présence de 4 stérols majoritaires (>5%), respectivement : Le  $\beta$ -sitostérol, le  $\Delta$ 5-avénastérol, la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol et le cholestérol (fig. 32, tab. 3).

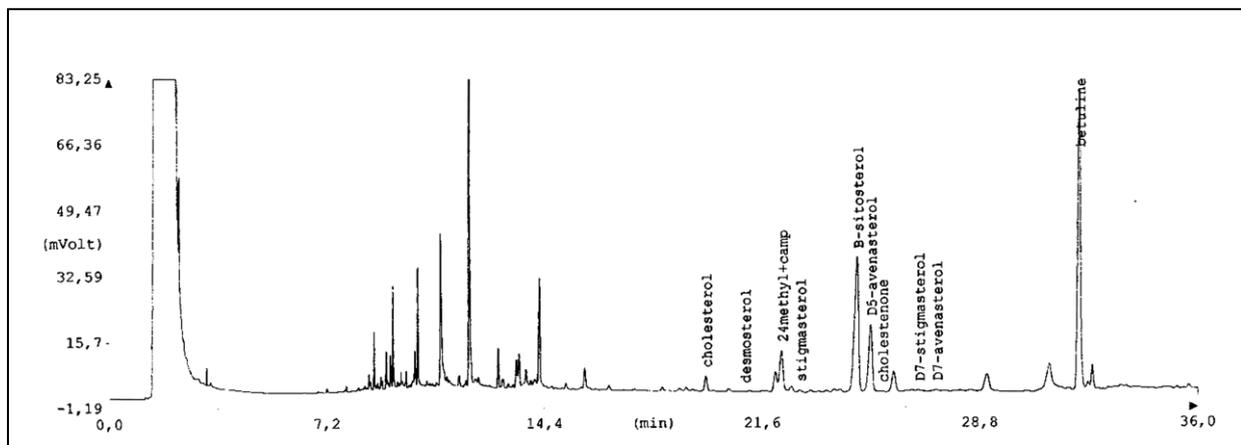


Figure 32 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes d'*Apis mellifera* sur *Cytisus scoparius*

**Tableau 3** : Composition stérolique des pelotes d'*Apis mellifera* sur *Cytisus scoparius*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bêtaïne. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 3 échantillons constitués de pelotes d'*A. mellifera* sur *Cytisus scoparius*. (ML, matière lyophilisée).

Stérols	Xmax	Xmin	X $\pm$ sd
Cholestérol	7,45	3,81	<b>6,22 <math>\pm</math> 2,09</b>
24-Méth.Chol. + camp.	23,47	17,7	<b>20,08 <math>\pm</math> 3,01</b>
Stigmasterol	0,71	0	0,44 $\pm$ 0,38
$\Delta$ 5-Avénastérol	23,26	15,55	<b>20,36 <math>\pm</math> 4,2</b>
Cholesténone	0,27	0	0,14 $\pm$ 0,13
$\Delta$ 7-Stigmasterol	0,86	0	0,5 $\pm$ 0,4
$\Delta$ 7-Avénastérol	2,07	0,37	1,02 $\pm$ 0,9
$\beta$ -Sitostérol	53,2	48,93	<b>51,24 <math>\pm</math> 2,16</b>
Teneur en stérols totaux	3218,75 $\mu$ g/ g ML	1194,21 $\mu$ g/ g ML	2460,17 $\pm$ 1103,52 $\mu$ g/ g ML

*Calluna vulgaris*

Pour les analyses du pollen de *Calluna vulgaris*, les stérols majoritaires (>5%) détectés sont, par ordre d'importance : Le  $\Delta 5$ -avénastérol, le  $\beta$ -sitostérol, le  $\Delta 7$ -avénastérol et la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol (fig. 33, tab. 4).

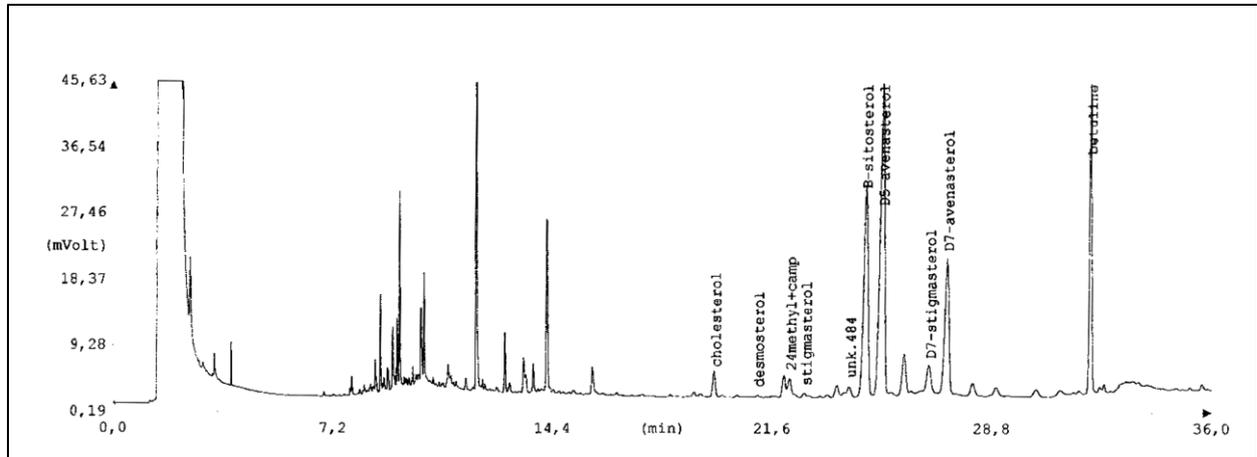


Fig. 33 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes d'*Apis mellifera* sur *Calluna vulgaris*

**Tableau 4** : Composition stérolique des pelotes d'*Apis mellifera* sur *Calluna vulgaris*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 3 échantillons constitués de pelotes d'*A. mellifera* sur *Calluna vulgaris*. (ML, matière lyophilisée).

Stérols	Xmax	Xmin	X ± sd
Cholestérol	5,6	3,18	4,01 ± 1,38
Desmostérol	0,2	0,02	0,09 ± 0,10
24-Méth.Chol. + camp.	8,54	4,08	<b>6,28 ± 2,23</b>
Stigmastérol	0,35	0,68	0,57 ± 0,19
$\Delta 5$ -Avénastérol	40,95	34,8	<b>37,86 ± 3,07</b>
Cholesténone	1,2	0	0,64 ± 0,61
$\Delta 7$ -Stigmastérol	4,62	4,02	4,36 ± 0,31
$\Delta 7$ -Avénastérol	25,05	17,27	<b>20,23 ± 4,21</b>
$\beta$ -Sitostérol	28,25	22,72	<b>25,96 ± 2,89</b>
Teneur en stérols totaux	9290,63 µg/ g ML	5011,11 µg/ g ML	7362±2170,98 µg/ g ML

*Vaccinium myrtillus*

A titre comparatif, les analyses stéroliques ont été menées sur les pelotes de bourdons sur le *V. myrtillus*. Les stérols majeurs sont : le  $\beta$ -sitostérol et le  $\Delta 5$  avénastérol (fig. 34, tab. 5).

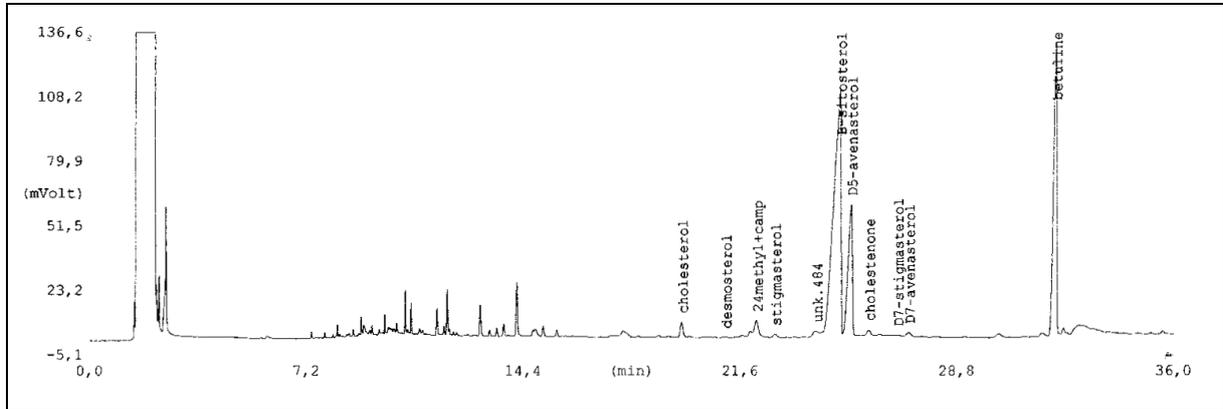


Figure 34 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes de *Bombus terrestris* sur *Vaccinium myrtillus*.

**Tableau 5** : Composition stérolique des pelotes de *Bombus terrestris* sur *Vaccinium myrtillus*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bêta-sitostérol. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 3 échantillons constitués de pelotes de *Bombus terrestris* sur *Vaccinium myrtillus*. (ML, matière lyophilisée).

Stérols	Xmax	Xmin	X ± sd
Cholestérol	2,75	1,58	1,87 ± 0,49
desmostérol	0,67	0,03	0,19 ± 0,27
24-Méth.Chol. + camp.	3,69	0,55	2,38 ± 1,18
Stigmastérol	0,48	0,05	0,38 ± 0,19
$\Delta 5$ -Avénastérol	27,43	18,41	<b>23,02 ± 3,28</b>
Cholesténone	2,81	1,01	1,55 ± 0,73
$\Delta 7$ -Stigmastérol	0,13	0,66	0,38 ± 0,21
$\Delta 7$ -Avénastérol	1,13	0,06	0,64 ± 0,38
$\beta$ -Sitostérol	74,33	62,51	<b>69,58 ± 4,41</b>
			6647,44 ±
Teneur en stérols	11655,35	4234,76	2954,35
Totaux	$\mu\text{g/ g ML}$	$\mu\text{g/ g ML}$	$\mu\text{g/ g ML}$

*Sorbus aucuparia*

Le nombre de stérols majoritaires (>5%), détectés lors des analyses micro-quantitatives est de 2 : la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol et le  $\Delta$ 5-avénastérol (fig. 35, tab. 6).

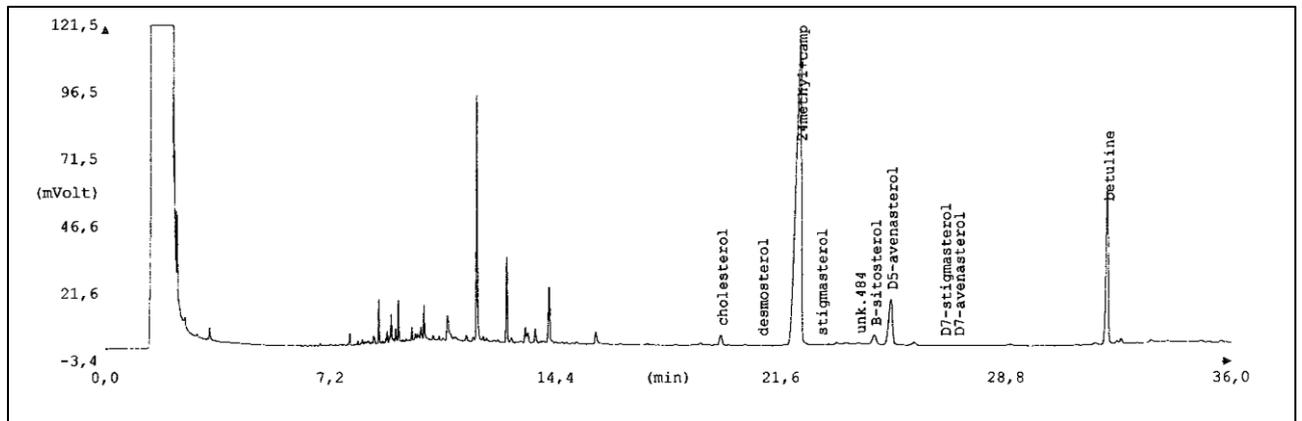


Figure 35 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes d'*Apis mellifera* sur *Sorbus aucuparia*

**Tableau 6 :** Composition stérolique des pelotes d'*Apis mellifera* sur *Sorbus aucuparia*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 3 échantillons constitués de pelotes d'*A. mellifera* sur *Sorbus aucuparia*. (ML, matière lyophilisée).

Stérols	Xmax	Xmin	X ± sd
Cholestérol	2,18	1,31	1,68 ± 0,45
Desmostérol	0,42	0,04	0,27 ± 0,20
24-Méth.Chol. + camp.	86,09	84,06	<b>84,81 ± 1,12</b>
Stigmastérol	0,44	0,22	0,33 ± 0,11
$\Delta$ 5-Avénastérol	10,19	9,91	<b>9,98 ± 0,18</b>
Cholesténone	0	0	0
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,23	0,04	0,13 ± 0,09
$\Delta$ 7-Avénastérol	0,15	0,06	0,12 ± 0,052
$\beta$ -Sitostérol	3,47	2,14	2,68 ± 0,7
			26325,20 ±
Teneur en stérols	45953,75	7739,18	17792,1
totaux	$\mu\text{g}/\text{g ML}$	$\mu\text{g}/\text{g ML}$	$\mu\text{g}/\text{g ML}$

*Salix caprea*

Les composés stéroliques majeurs (>5%) observés dans l'analyse du pollen de *Salix caprea* sont, par ordre d'importance : le  $\beta$ -sitostérol, le  $\Delta$ 5-avénastérol, l'inconnue du saule et la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol.

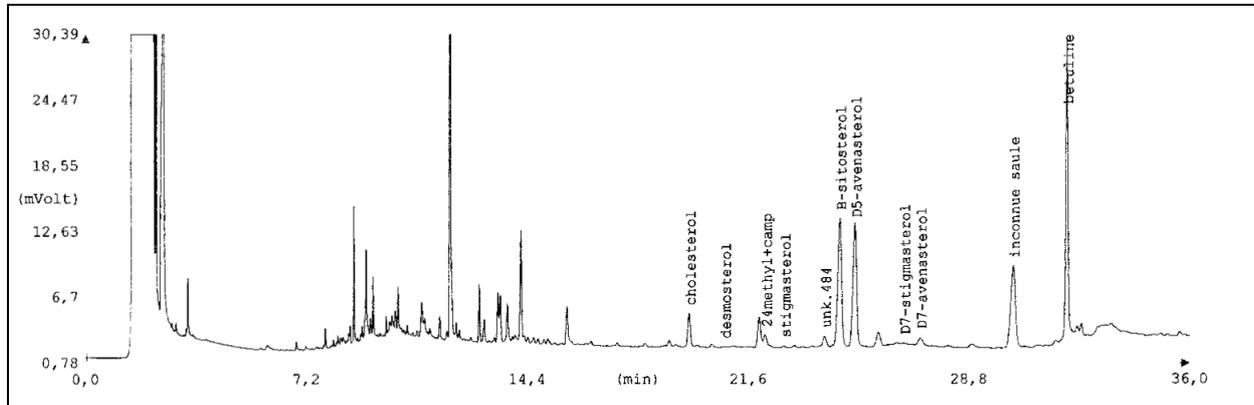


Figure 36 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes d'*Apis mellifera* sur *Salix caprea*

**Tableau 7 :** Composition stérolique des pelotes d'*Apis mellifera* sur *Salix caprea*. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 3 échantillons constitués de pelotes d'*A. mellifera* sur *Salix caprea*. (ML, matière lyophilisée).

Stérols			
	Xmax	Xmin	X $\pm$ sd
Cholestérol	5,48	2,31	3,46 $\pm$ 1,75
Desmostérol	0,18	0,04	0,13 $\pm$ 0,08
24-Méth.Chol. + camp.	8,59	4,16	<b>5,72 <math>\pm</math> 2,48</b>
Stigmastérol	0,48	0,24	0,37 $\pm$ 0,12
Inconnue du saule	23,08	15,05	<b>19,46 <math>\pm</math> 4,07</b>
$\Delta$ 5-Avénaastérol	36,84	27,96	<b>31,06 <math>\pm</math> 5,01</b>
Cholesténone	0,81	0	0,27 $\pm$ 0,47
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,86	0,04	1,35 $\pm$ 0,28
$\Delta$ 7-Avénaastérol	2,29	0	1,17 $\pm$ 1,15
$\beta$ -Sitostérol	41,25	30,11	<b>36,98 <math>\pm</math> 6</b>
Teneur en stérols totaux	7463,28 $\mu$ g/ g ML	5521,14 $\mu$ g/ g ML	6590,75 $\pm$ 985,96 $\mu$ g/ g ML

*Cistus* sp.

Grâce aux analyses stéroliques du pollen de *Cistus* sp., nous connaissons les 3 stérols majoritaires de ce pollen que sont le  $\beta$ -sitostérol, le  $\Delta 5$ -avénastérol et la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol (fig. 37, tab. 8).

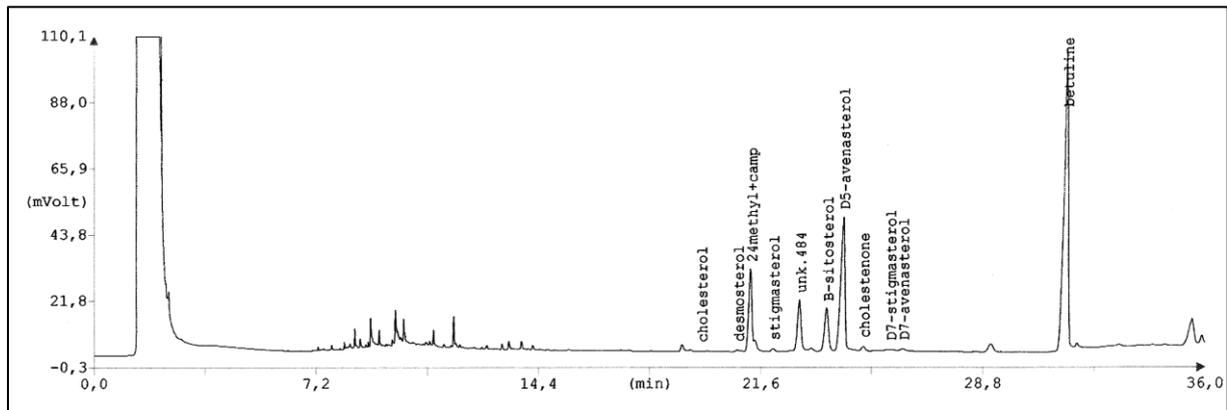


Figure 37 : Chromatogramme d'un échantillon de pelotes d'*Apis mellifera* sur *Cistus* sp.

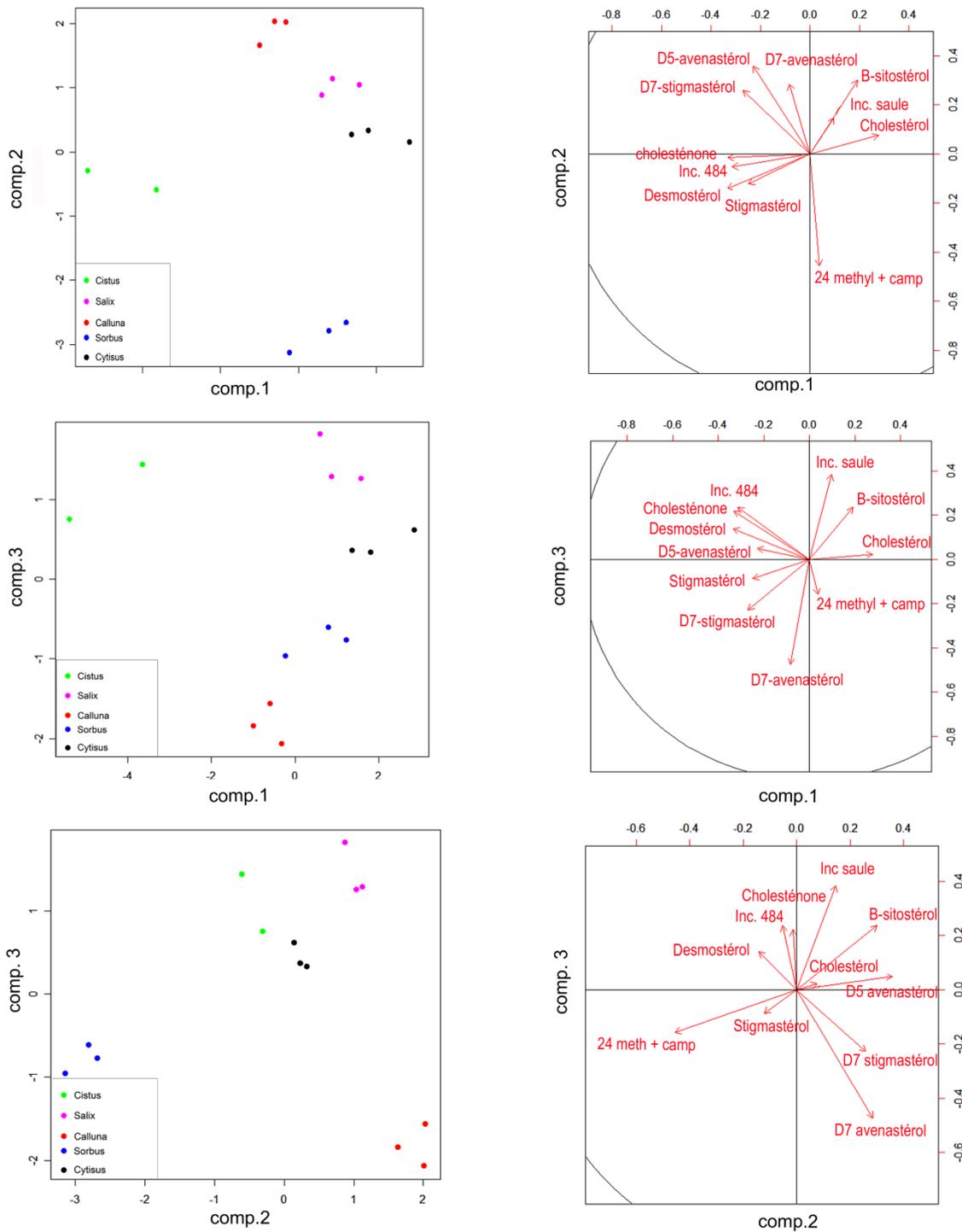
**Tableau 8** : Composition stérolique des pelotes d'*Apis mellifera* sur *Cistus* sp. Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. Teneur en stérols totaux, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la betuline. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). L'analyse a été effectuée sur 2 échantillons constitués de pelotes d'*A. mellifera* sur *Cistus* sp. (ML, matière lyophilisée).

Stérols	Xmax	Xmin	X $\pm$ sd
Cholestérol	0,41	0,06	0,23 $\pm$ 0,33
Desmostérol	1,11	0,64	0,87 $\pm$ 0,33
24-Méth.Chol. + camp.	22,71	21,71	<b>22,21 <math>\pm</math> 0,7</b>
Stigmastérol	1,39	0,83	1,11 $\pm$ 0,39
$\Delta 5$ -Avénastérol	42,83	42,34	<b>42,58 <math>\pm</math> 0,34</b>
Cholesténone	2,2	1,67	1,94 $\pm$ 0,38
$\Delta 7$ -Stigmastérol	5,54	1,82	3,68 $\pm$ 2,64
$\Delta 7$ -Avénastérol	3,56	1,39	2,47 $\pm$ 1,54
$\beta$ -Sitostérol	13,18	10,85	<b>12,02 <math>\pm</math> 1,65</b>
Teneur en stérols totaux	2802,73	2146,86	2474,80 $\pm$ 463,76
	$\mu\text{g}/\text{g ML}$	$\mu\text{g}/\text{g ML}$	$\mu\text{g}/\text{g ML}$

### 3.2.2. Analyse statistique des composés stéroliques

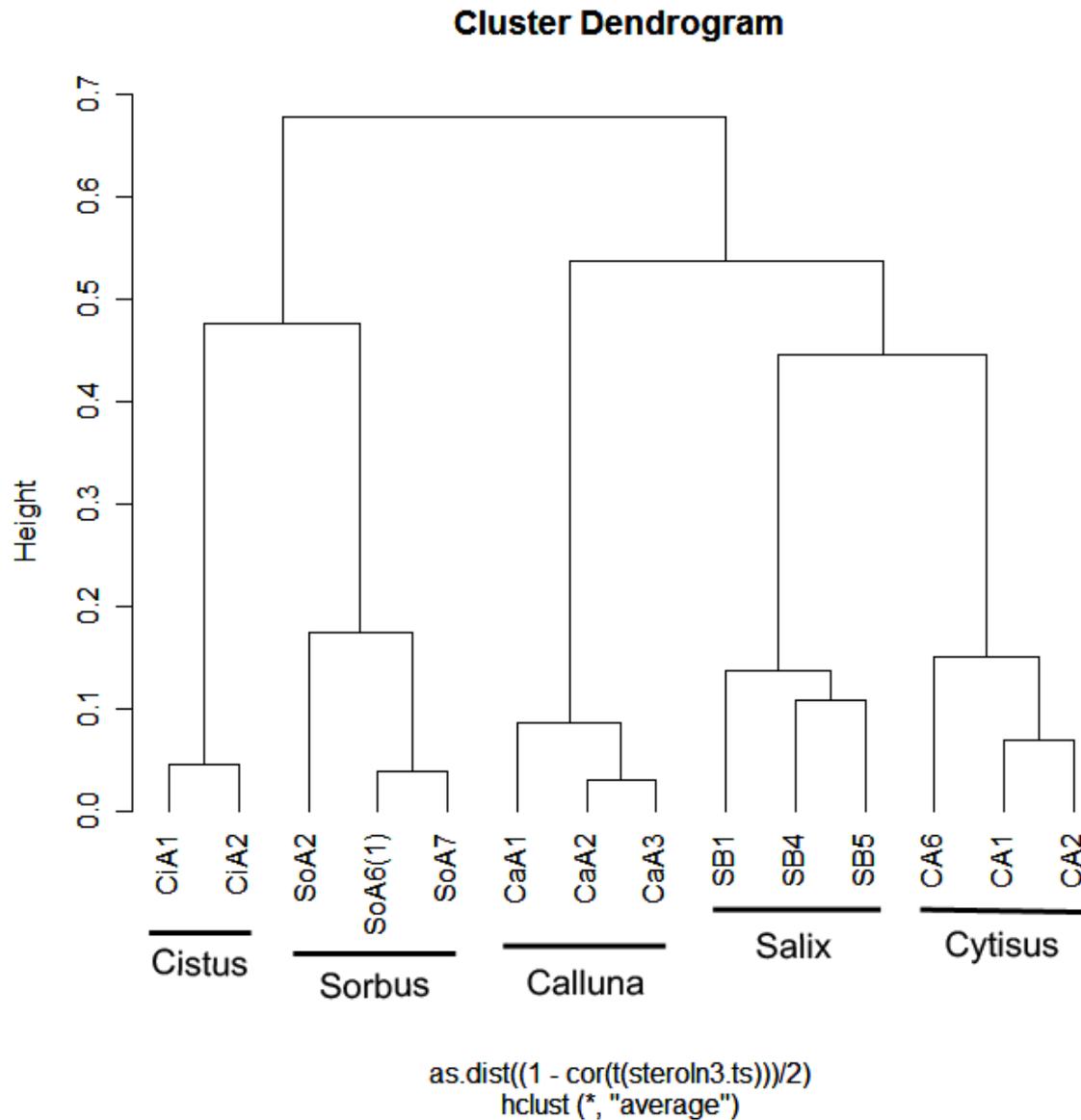
Une ACP sur base de la matrice brute a été réalisée (Fig. 38). Les 3 premières composantes expliquent 80.5% de la variance (40.78 % pour la composante 1, 25.66% pour la composante 2 et 14.1% pour la composante 3). Un dendrogramme réalisé selon la méthode UPGMA basé sur une matrice de corrélation est également présenté (fig. 39).

Comparaison des différents pollens suivant leur composition stérolique :



**Figure 38** : Analyse en composantes principales pour les compositions stéroliques des différentes pelotes de pollen envisagées dans cette étude. A droite, l'espace des variables représentant la participation de chaque stérol à chacune des composantes. A gauche, l'espace des individus représentant la position de chaque échantillon par rapport à chacune des composantes.

Le dendrogramme (fig. 39) délimite clairement 5 groupes définissant les 5 variétés de pollens étudiées. Le profil stérolique des pelotes de ciste est proche de celui des pelotes de callune. Les profils du genêt et du saule sont également proches. Par contre, le profil du sorbier est plus caractéristique. D'autres méthodes ont été testées mais renvoient au même type de résultats.



**Figure 39** : Dendrogramme UPGMA basé sur la matrice de corrélation des profils stéroliques de tous les échantillons de pollen analysés dans cette étude.

### 3.2.3. Analyse des protéines

Les résultats indiquent que le pollen de callune est une ressource pollinique dont le taux de protéines (4,5%) est faible, comme pour le ciste (2,25%). Les pollens de genêt, de saule et surtout de sorbier ont, quant à eux, de plus hautes concentrations en protéines (tab. 9).

**Tableau 9 :** Résultats des concentrations protéiques moyennes (masse sèche) des pelotes de pollen étudiées sur base de la mesure de l'absorbance (480 nm) et des équations obtenues à partir de la courbe de calibration du standard (BSA) présentée en annexes 26 et 27.

<b>Echantillon</b>	<b>Absorbance</b>	<b>Pourcentage Protéique moyen</b>	<b>N</b>
Callune	0,657	2,9 ± 1,4 %	3
Genêt	0,545	7,4 ± 1,4 %	3
Sorbier	0,474	9,6 ± 2,3 %	3
Saule	0,441	6,7 ± 1,2 %	3
Ciste	0,660	2,3 ± 0,2 %	3
Myrtille	0,620	3,8 ± 0,07 %	2

### 3.2.4. Analyse des sucres

Il y a peu de différences au niveau de la concentration des sucres des différents pollens étudiés. Une différence qualitative notable est l'absence d'erlose dans le pollen de ciste et de callune (tab. 10 et 11).

**Tableau 10** : Identification des sucres présents dans les pelotes des pollens étudiées sur base des analyses HPLC. (X) Présence du sucre, (-) absence du sucre.

	<b>ciste</b>	<b>saule</b>	<b>sorbier</b>	<b>genêt</b>	<b>callune</b>
<b>sorbitol</b>	X	X	X	X	X
<b>Tréhalose</b>	-	-	-	-	-
<b>Rhamnose</b>	-	-	-	-	-
<b>Glucose</b>	X	X	X	X	X
<b>Fructose</b>	X	X	X	X	X
<b>Mélibiose</b>	X	X	X	X	X
<b>Saccharose</b>	X	X	X	X	X
<b>Stachyose</b>	X	X	X	X	X
<b>Mélézitose</b>	X	X	X	X	X
<b>Maltose</b>	X	X	X	X	X
<b>Raffinose</b>	X	X	X	X	X
<b>erlose</b>	-	X	X	X	-

**Tableau 11** : Résultats des concentrations totales en sucres (% et masse sèche) présentes sur les pelotes d'*Apis mellifera* d'origines végétales différentes (analyse HPIC).

<b>Pollen</b>	<b>Sucre externe total détecté (%)</b>
Callune	3,81
Ciste	4,93
Saule	4,17
Genêt	4,67
Sorbier	4,97

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Différence de composition entre les pelotes d'*Apis* et de *Bombus*

Afin de valider l'utilisation de pelotes d'*Apis mellifera* pour l'élevage de *Bombus terrestris*, nous avons effectué, en parallèle de ce travail, des analyses comparatives entre les pelotes de *Bombus* et d'*Apis* de même origine florale. Cependant, pour ne pas surcharger ce travail en données complémentaires, les résultats de ces analyses ne seront que discutés.

Pour les stérols, des différences ont été observées au cours des analyses. Ces différences stéroliques avaient déjà été observées par Rasmont *et al.* (2005). Les auteurs indiquaient une présence remarquable de  $\beta$ -sitostérol dans le pollen scopal de bourdons sur *Arbutus unedo*. Nos analyses montrent également une présence plus importante de  $\beta$ -sitostérol dans le pollen des pelotes de bourdons en comparaison avec celui des abeilles domestiques sur une même ressource. Les microcolonies utilisées ont donc reçu, lors du test d'élevage, une diète plus pauvre en  $\beta$ -sitostérol que dans les diètes des colonies *in natura*.

Regali (1996) montre que l'ajout de  $\beta$ -sitostérol dans des diètes de microcolonies de *Bombus terrestris dalmatinus* n'a pas d'influence sur leur développement. Il est donc correct d'estimer que les effets des diètes utilisées à partir des pelotes d'*Apis mellifera* sont comparables aux effets des diètes dont disposent les bourdons en milieu naturel.

Le  $\beta$ -sitostérol interviendrait au niveau de l'appétence. Debaille (1995) montre que les abeilles domestiques ont une nette répulsion pour le  $\beta$ -sitostérol. De même, il indique que dans des milieux où la compétition est intense entre *Apis* et bourdons, les bourdons s'orientent sur des pollens délaissés par les abeilles domestiques et par conséquent plus riches en  $\beta$ -sitostérol. Il semble donc que les stérols puissent jouer un rôle dans le choix des ressources polliniques. Cependant, nos résultats montrent que pour une même ressource, la composition entre pelotes de bourdons et pelotes d'*Apis mellifera* change. Il y aurait ainsi, chez le bourdon, un ajout, ou une transformation d'un autre stérol en  $\beta$ -sitostérol. Ainsi, non seulement les bourdons seraient orientés vers des espèces végétales plus riches en  $\beta$ -sitostérol mais en plus, ils en ajouteraient lors de l'élaboration de leurs pelotes.

## 4.2. Différence entre *Calluna vulgaris* et *Vaccinium* sp.

Comme indiqué dans le matériel et méthode, nous n'avons pas pu collecter de pollen de *Vaccinium uliginosum* et nous avons décidé, pour les analyses palynologiques, de travailler avec *Vaccinium myrtillus*. Etant donné la faible variabilité des concentrations protéiques au sein d'un même genre de plante (Roulston *et al.* 2000), nous pouvons considérer la concentration protéique de *V. uliginosum* comme proche de celle de *V. myrtillus* (3,8%) et donc comme faible au vu des autres résultats. Sachant cela, nous pouvons estimer qu'une alimentation composée exclusivement de pollen de *Vaccinium* sp. apporterait des résultats similaires à ceux de la callune ou du ciste, c'est-à-dire : une consommation importante de pollen avant et après la ponte, une consommation importante de sirop et surtout une faible efficacité du pollen.

*C. vulgaris* et *V. myrtillus* partagent 2 stérols majoritaires que sont le  $\Delta 5$ -avénastérol et le  $\beta$ -sitostérol. Ce dernier est beaucoup plus présent chez *V. myrtillus* (69%). *C. vulgaris*, contrairement à *V. myrtillus*, compte aussi le  $\Delta 7$ -avénastérol comme stérol majoritaire. La présence du  $\beta$ -sitostérol pourrait expliquer les visites de bourdons sur ces plantes, pourtant pauvres en protéines (Debaille, 1995 ; Rasmont *et al.* 2005). Notons qu'il faut prendre cette remarque avec prudence car les analyses de *V. myrtillus* ont été faites sur des pelotes de *Bombus* que l'on sait désormais plus riches en  $\beta$ -sitostérol. Des analyses comparées sur des pelotes de mêmes natures devront donc être réalisées pour confirmer une présence plus importante en ce stérol chez *V. myrtillus*.

## 4.3. Analyse et extraction des protéines

Le taux de protéines présent dans le pollen varie de 2,5% à 61 % (Buchmann, 1986 cité par Roulston *et al.* 2000). Nos résultats présentent des valeurs plus faibles allant de 2,3% (ciste) à 9,6% (sorbier). Cette différence peut s'expliquer par la technique d'extraction utilisée qui ne libère que les protéines solubles et n'utilise pas un facteur de conversion de l'azote comme c'est le cas pour le micro-Kjeldahl (Rabie *et al.* 1983). Mais notre méthode présente l'avantage d'utiliser une faible quantité de matériel de départ (10mg) alors qu'il faut 1000 mg pour un micro-Kjeldahl. Etant donné que nous n'utilisons pas de composés perturbateurs pour les protéines (solvant, SDS, etc), il est possible d'effectuer des analyses plus poussées sur le même

échantillon et ce, après sa quantification. Cette méthode est aussi très rapide, ne nécessitant que 3h de manipulation.

Roulston *et al.* (2000) indiquent que le pollen des plantes nécessitant une pollinisation par vibration ou « buzzing » est particulièrement riche en protéine. Nos résultats sont différents. En effet, les Ericaceae étudiées et dont la récolte du pollen est effectuée par « buzzing » (Chyzy, 2009), montrent de faibles valeurs protéiques. Cette différence pourrait à nouveau s'expliquer par les techniques différentes utilisées.

#### 4.4. Influence de la composition du pollen sur le développement de microcolonies

Il a déjà été montré que la source de pollen influence le développement de microcolonies (Génissel *et al.*, 2002). Cette même étude ne montre pas de différences dans la consommation du pollen selon son origine. L'étude de Tasei & Aupinel (2008) suggère que le taux de protéines ne doit pas être considéré comme le seul élément nutritif important du pollen et qu'un mélange de pollen pourrait apporter des propriétés nutritives supplémentaires. Regali & Rasmont (1995) notent aussi la bonne qualité nutritionnelle que constitue un pollen riche en protéines mais n'utilisent pas de pollen pur dans leurs analyses.

Une alimentation constituée de pollen de ciste pur est de mauvaise qualité nutritionnelle pour le développement de microcolonies de bourdons terrestre et ce, quels que soient les paramètres mesurés lors du test. Ce sont ces colonies qui consomment le plus de pollen (avant et après la ponte). Les mesures concernant les larves indiquent également la pauvreté du pollen. Les larves sont de poids nettement inférieur aux larves des colonies nourries avec les autres pollens, callune excepté. Etant donné que l'élément nutritionnel le plus important pour le développement des larves est la richesse en protéines, les résultats suggèrent une pauvreté protéique du pollen de ciste. Cela a déjà été sujet à discussion lors d'autres études (Percie du Sert, 2009). On y apprend que le pollen de ciste est pauvre en acides aminés essentiels. Ce pollen est également peu digeste pour les bourdons, 75% des grains de pollens sont non digérés après analyse des fèces (Roelandts, 2010).

Les meilleurs résultats obtenus, tant au niveau des quantités de protéines solubles que des résultats d'élevages, sont ceux du sorbier et du genêt. Les résultats pour le pollen de sorbier sont cependant remarquables. Le plus haut taux de protéines (9,6%) et l'absence de mortalité des ouvrières lors de l'élevage font du sorbier un pollen de meilleure qualité que le genêt. Le taux de mortalité élevé lors d'une alimentation pure en genêt n'a pas été expliqué. Une étude des alcaloïdes présents dans ce pollen pourrait donner plus d'informations quant à sa possible toxicité.

Le pollen de sorbier est aussi distinguable par sa composition en stérols. Il possède un niveau en fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol qui le différencie des autres pollens. La méthode d'analyse ne permettant pas de distinguer ces 2 composés qui coéluent, il n'est pas possible d'affirmer quel composé serait responsable de la qualité du pollen de sorbier. Chez les abeilles (*Apis mellifera* L.), le 24-méthylènecholestérol est le stérol tissulaire dominant. Il est aussi le stérol majeur du couvain dont elles s'occupent (Svoboda *et al.*, 1983). Il joue donc un rôle majeur dans le métabolisme des abeilles. Les stérols les plus importants pour les abeilles domestiques sont le cholestérol et le 24-méthylènecholestérol (Svoboda *et al.* 1980). Sachant cela, c'est probablement le 24-méthylènecholestérol qui est important.

Cependant, Demol (1994) montre que la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol est moins assimilée lors de la digestion de *Bombus terrestris* que le  $\beta$ -sitostérol.

Regali & Rasmont (1995) indiquent qu'un pollen est plus consommé lorsqu'il est plus appétent. Cependant, il pourrait en être de même pour un pollen de faible valeur nutritionnelle. Le bourdon serait obligé de consommer une quantité plus importante de pollen pour sa survie en raison du manque de nutriments.

Si d'un point de vue purement nutritif, le pollen de sorbier donne de très bons résultats, faut-il encore qu'il soit collecté par les bourdons sur le terrain. Nous savons que c'est le cas car du pollen de *Sorbus aucuparia* est retrouvé dans des pelotes de bourdons en Hautes-Ardenne (Chyzy, 2009). Cependant, nous savons aussi que les bourdons privilégient des plantes avec une symétrie bilatérale et une couleur bleue ou mauve (Debaille, 1995), ce qui n'est pas du tout le cas du sorbier qui possède une symétrie radiaire et une couleur blanche. Le *Cytisus scoparius* devrait, de par sa symétrie bilatérale, avoir plus de succès en condition naturelle. Etant donné qu'il possède en plus un haut taux de protéine (7,4%) et permet un bon développement des larves, il devrait être conservé.

Des remarques seraient à faire sur l'absence d'érlose sur les pelotes de pollen de qualité nutritionnelle moindre (callune et ciste). Cependant, il y a très peu d'information dans la littérature à ce sujet. Nous suggérons une absence de ce sucre dans le nectar de ces deux plantes. Ce qui expliquerait que l'abeille n'en n'utilise pas pour confectionner ses pelotes. Par contre, au vu des concentrations similaires en sucres entre les différentes pelotes, il est probable que l'*Apis mellifera* utilise une quantité peu variable de sucre pour agglomérer ses pelotes. Cela pourrait s'expliquer par une similarité de l'ultra-structure des grains de pollen des ressources étudiées (Vaissière & Vinson, 1994).

#### 4.5. Impact de la diversité des ressources sur le développement de microcolonies

Taseï & Aupinel (2008) suggèrent qu'un mélange de pollen sera d'autant plus efficace qu'il cumule une haute concentration en protéine. Pour nos 2 paramètres les plus représentatifs (poids moyen d'une larve et efficacité du pollen), les combinaisons des 3 pollens sont sans différence significative avec les résultats les plus hauts. Ces remarques s'appliquent aussi pour les doubles combinaisons. En effet, le mélange sorbier et genêt, qui cumule le pourcentage protéique de la diète maximal (17%) offre une efficacité protéique significativement plus haute que les combinaisons callune-genêt (10,3%) et callune-sorbier (12,5%).

On observe un effet de renforcement entre le sorbier et le genêt. Une diète composée des 2 pollens est meilleure qu'une diète simple même s'il n'y a pas de différence significative. Par contre, l'ajout de callune dans les diètes provoque un effet négatif sur le développement (au vu du paramètre de l'efficacité du pollen).

Il est intéressant de constater que les bourdons nourris avec les pollens les plus efficaces ont tendance à consommer moins de sirop et inversement. Il semble que le sirop permet de compenser un manque nutritionnel des pollens les moins efficaces. Cela confirme les résultats de Roelandts (2010). Ainsi, des colonies utilisant une diversité de ressources dont le pollen résultant est de haute efficacité (sorbier et genêt), auraient besoin d'une quantité de sirop moindre que des colonies intégrant dans cette diversité alimentaire un pollen de mauvaise qualité (callune).

La diversité des ressources a également un rôle critique pour le bon fonctionnement du système immunitaire des abeille mellifères (Alaux *et al.*, 2010). Cette hypothèse reste à tester chez les bourdons.

#### 4.6. Mesures de conservations

La relation entre le déclin de certains bourdons et celui de leurs ressources a été soulignée par Kleijn & Raemakers (2008).

Dans bon nombre de cas, une seule ressource ne suffit pas. Ainsi, un paysage constitué uniquement de *Vaccinium uliginosum* serait très défavorable au développement des communautés de bourdons locales. Il n’y a pas de bonnes ou de mauvaises ressources mais il y a des ressources clés. Ainsi, pour les ressources polliniques, le *Cytisus scoparius* et le *Sorbus aucuparia* semblent de bons candidats. Stout (2000) indique que les bourdons sont les pollinisateurs les plus efficaces du *Cytisus scoparius*, ils sont attirés par les enseignes à nectar (bien que la plante en soit dépourvue). Ce qui montre à nouveau que le *Cytisus scoparius* seul ne suffit pas car cela provoquerait un manque de nectar. Pour le *Sorbus*, bien qu’il soit un pollen de bonne qualité nutritionnelle, les bourdons représentent un faible pourcentage des visiteurs (6-7%) (Raspé *et al.*, 2000).

Du mélange de certaines ressources clés, résulte une haute efficacité alimentaire. Mais d’autres ressources ont, au contraire, tendance à avoir un effet négatif sur l’efficacité globale du mélange. Ainsi, et ne considérant que l’aspect pollinique, un paysage constitué de genêt et de sorbier est préférable à ce même paysage complétement de callune.

Les bourdons collectent souvent le pollen et le nectar sur des plantes différentes (Liu *et al.*, 1975 cité par Rasheed & Harder, 1997). Il faut donc, tenir compte de ce paramètre supplémentaire lors de la gestion des espèces végétales nécessaires pour le bon développement des colonies *in natura*.

## 5. CONCLUSION

Dans les pollens analysés, certains stérols comme le 24-méthylènecholestérol semblent avoir un effet positif sur le développement de *Bombus terrestris*.

Nous avons confirmé l'importance que constitue une diète riche en protéine.

Nous avons confirmé l'idée de Roelandts (2010) que les bourdons compensent une diète de faible valeur nutritive par une consommation plus importante de sirop.

Le *Cytisus scoparius* et le *Sorbus aucuparia* sont de meilleures ressources pour le développement de microcolonies de boudons que *Calluna vulgaris* et probablement aussi que *Vaccinium uliginosum*. Cependant, les observations sur le terrain montrent que *Vaccinium uliginosum* attire quand même les bourdons. Nous suggérons que la présence importante de  $\beta$ -sitostérol dans cette ressource joue un rôle dans l'appétence et donc l'attractivité, confirmant ainsi les résultats de Regali (1996).

Les problèmes rencontrés lors de la collecte de certains pollens et les différences de profil entre les pollens des pelotes de *Bombus* et d'*Apis* confirment l'idée de Rasmont (2005). Le pollen de certaines plantes renferme des nutriments plus exploitables par les bourdons que par l'abeille domestique. Cela se traduit par une exploitation différente des ressources.

Ainsi, certaines ressources ont une fonction critique dans les milieux du fait de leur grande valeur nutritive. Mais il ne faudrait pas négliger les ressources de nectar et le rôle des ressources d'une grande appétence. En effet, l'intérêt de sauvegarder des ressources de grandes valeurs nutritives n'est valable que si les bourdons sont capables de détecter cette qualité nutritionnelle.

## 6. PERSPECTIVES

Ces mesures devraient être reproduites sur des colonies complètes de bourdons pour confirmer les résultats. L'influence des ressources sur le système immunitaire des bourdons devrait aussi être prise en compte pour compléter notre compréhension de l'impact des modifications anthropiques sur les pollinisateurs.

Des tests sous serre devraient être imaginés pour permettre de faire intervenir le choix des bourdons qui pourraient être influencé par la morphologie florale, le parfum de la fleur et l'appétence du pollen.

Le protocole de collecte du pollen utilisé dans ce travail ne peut s'appliquer que pour des ressources appréciées à la fois des bourdons et des abeilles domestiques. Pour tester des ressources plus spécifiques aux bourdons, une autre méthode devra être mise au point.

Nous tentons actuellement un nouveau protocole d'analyse protéique sur l'extraction des protéines totales (Wang *et al.* 2006) pour tenter de confirmer les résultats précédemment discutés.

Des études sur l'importance de la diversité des ressources de nectar devraient aussi être entreprises.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- Alford D. V., 1975.** *Bumblebees*. Davis-Poynter, London, 352 p.
- Allaux 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.
- Allaux C., Ducloz F., Crauser D. & Le Conte Y., 2010.** Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology letters Published online*, doi:10.1098/rsbl.2009.0986.
- Allsopp M.H., de Lange W.J. and Veldtmann R., 2008.** Valuing insect pollination services with cost of replacement. *Insect pollination replacement* 3 (9) : 1-8.
- Bastin B., De Sloover J. R., Evrard C., Moens P. 1996.** *Flore de la Belgique (Pteridophytes et Spermatophytes)*. Artel, Belgique, 359 p.
- Batley M. & Hogendoorn K.,2009.** Diversity and conservation status of native Australian bees. *Apidologie*, 40 : 347-354
- Berthet J., 2006.** *Dictionnaire de Biologie*. De Boeck & Larcier s.a. Bruxelles. 1er édition
- Biesmeijer J. C., Roberts S. P. M., Reemer M., Ohlemüller R., et al.** Parallel declines in pollination and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands. *Science* (313): 351-354.
- Bloch G. & Hefetz A., 1999.** Regulation of reproduction by dominant workers in bumblebee (*Bombus terrestris*) queenright colonies. *Behaviour Ecology Sociobiology* 45 : 125-135.
- Bredat E., 2010.** *Conservation des interactions entre Vaccinium uliginosum L. et ses visiteurs*. Mémoire de fin d'études Université de Mons, 89 p.
- Brown M.J.F. & Paxton R.J., 2009.** The conservation of bees: global perspective. *Apidologie*, 40:410-416.
- Buchmann, S. L., 1986.** Vibratile pollination in *Solanum* and *Lycopersicon*: A look at pollen chemistry. In W. G. D'Arcy (Ed.), *Solanaceae II: Biology and systematics* (pp. 237–252).New York: Columbia Univ. Press.
- Bushmann S., Nabhan G.P. 1996.** *The forgotten pollinators*. Island Press, Shearwater books, Washington D. C., 292 p.
- Cameron S. A., Lozier J. D., Strange J. P., Koch J. B., Cordes N., Solter L. F. & Griswold T. L., 2011.** Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *PNAS* : 1-6
- Chyzy A., 2009.** *Structure de la communauté des visiteurs de V. uliginosum L. en fonction de la taille des populations ressources*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons, 69 p.
- Clark A.J. & Bloch K., 1959.** Function of sterols in *Dermestes vulpinus*. *The journal of Biological Chemistry*, vol 234 (10) : 2583-2588.
- Coste H., 1990.** *Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes (I)*. Librairie scientifique et technique Albert Blanchard, Paris, 414p.

**Debaille F., 1995**, *Partage des ressources polliniques entre abeille domestiques (Apis mellifera L.) et bourdons (Bombus terrestris (L.)) en fonction de la présence ou de l'absence de B-sitostérol: mise au point d'une method expérimentale*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons, 68p.

**De Groot, A.P. 1953**. Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Physiologia Comparata et Oecologia*, 3 : 197-285.

**Demol P., 1994**. *Etude quantitative de la digestibilité des acides aminés et des stérols chez Bombus terrestris L. (Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'étude Université de Mons, 72p.

**Detroy B.F. and Harp E.R., 2009**. Pollen Traps-Trapping Pollen From Honey Bee Colonies. *Agricultural Research Service* 53706, 8p.

**Duchateau M. J. & Velthuis H. H. W., 1989**. Ovarian development and egg laying in workers of *Bombus terrestris*. *Entomologia Experimentalis Applicata* 51 : 199-213.

**Eardley C. D., Gikungu M. & Schwarz M. P., 2009**. Bee conservation in Sub-Saharan Africa and Madagascar: diversity, status and threats. *Apidologie* 40: 355-366.

**Exeler N., Kratochwil A. & Hochkirch A., 2010**. Does recent habitat fragmentation affect the population genetics of a heathland specialist, *Andrena fuscipes* (Hymenoptera: Andrenidae) ? *Conservation Genetic* 11: 1679-1687.

**Feldaufer M.F., Svoboda J.A. 1988**. Phytosterol utilization in the honey bee : selective sterol transfer and ecdysteroid biosynthesis, p. 99-104 in: **Sehnal F., Zabza A., & Denlinger D.L. {eds.}**, *Endocrinological frontiers in physiological insect ecology*, Wroclaw Technical University Press, Wroclaw.

**Free J.B., 1993**. Insect pollination of crops. *Ed. Academic press*.684 pg.

**Freitas B.M., Imperatriz-Fonseca V.L., Medina L.M., Kleinert A.M., Galetto L., Nates-Parra G. & Quezada-Euan J.J.G., 2009**. Diversity, threats and conservation of native bees in the Neotropics. *Apidologie*, 40:332-346.

**Gallai N., Salles J-M., Settele J. & Vaisière B. E., 2009**. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological economics* 68 : 810-821.

**Génissel A., Aupinel P., Bressac C., Tasei J-N. et Chevrier C., 2002**. Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata* (104) : 329-336.

**Goulson D., 2003**. Conserving wild bees for crop pollination. *Food, Agriculture & Environment*. Vol 1 (1): 142-144.

**Goulson D., Lye G. C. & Darvill B., 2008**. Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* 53: 91-208.

**Haddad N. M. & Baum K.A., 1999**. An experimental test of corridor effect on butterfly densities. *Ecological applications* 9 (2) : 623-633.

**Heftmann E., 1970**. Functions of sterols in plants. *Lipids* (2), 6 : 128-133.

**Heinrich B., 1979**. *Bumblebee economics*. Harvard university press, Cambridge, Massachusetts

- Hobson R.P., 1935.** On a fat-soluble growth factor required by blow-fly larvae. *Biochemistry Journal* 29(9) : 2023-2026.
- Hügel M.F., 1962.** Etude de quelques constituants du pollen. *Annals de l'Abeille* 5, (2), 97-133
- Inari N., Nagamitsu T., Kenta T., Goka K. and Hiura T., 2005.** Spatial and temporal pattern of introduced *Bombus terrestris* abundance in Hokkaido, Japan, and its potential impact on native bumblebees. *Population Ecology*. 47 : 77-82.
- Ings T.C., Ings N.L., Chittka L. and Rasmont P., 2009.** A failed invasion ? Commercially introduced pollinators in Southern France. *Apidologie* 41 : 1-13
- Jacquemart A-L. 1992.** Préliminaires sur la production de nectar chez trois espèces de *Vaccinium*. *Apidologie* 23: 453-464.
- Jacquemart A.-L. 1993.** Floral visitors of *Vaccinium* species in the High Ardennes, Belgium. *Flora* 188: 263-273.
- Jacquemart A-L. 1996.** *Vaccinium uliginosum* L. *Journal of ecology*, 84 : 771-785.
- Jacquemart A-L., Angenot A., De Sloover J., Iserentant R., 2008.** La réserve naturelle domaniale du plateau des Tailles et ses milieu tourbeux – approche géographique, historique et biologique. *Glain et Salm, Haute-Ardenne* 62, 130 p.
- Kearns C. A., Inouye D. W. & Waser N. M., 1998.** Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112.
- Keller I., Fluri P. & Imdorf A., 2004.** Le pollen et le développement des colonies chez l'abeille mellifera-1ère partie. *Bee world* : 1-13
- Kleijn D., Raemakers I., 2008.** A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology*, 89(7) : 1811-1823.
- Krauss J., Bommaco R., Guardiola M., Heikkinen R. K., Kuussaari M. et al.,** Habitat fragmentation causes immediate and time-delayed biodiversity loss at different trophic levels. *Ecology letters* 13: 597-605.
- Kroon G. H., Van Praagh J. P., Veltuis H. H. W., 1974.** Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the alimentary tract of the worker honeybee. *Journal of Apicultural Research*. 13: 177-181.
- Lavie P. & Fresnaye J., 1963.** Etude expérimentale de la trappe a pollen en position supérieure. *Annales de l'Abeille* 6 (4) : 277-301.
- Lazaro A. & Totland O., 2010.** Local floral composition and the behavior of pollinators: attraction to and foraging within experimental patches. *Ecological entomology*, 35 : 652-661.
- Lévêque C. & Mounolou J-C., 2001.** *Biodiversité, Dynamique biologique et conservation*. Ed. Dunod, Paris, 248 p.
- Lognay G., Dreze P., Wagstaffe P.J., 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., Severin M. 1992.** Edible fats and oil 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.
- Mayer C., Michez D., Chyzy A., Bredat E., Moerman R. & Jacquemart A-L.** Population size of *Vaccinium uliginosum* (Ericaceae) effects on bumble bee assemblages and pollen foraging behavior. *Soumis*.
- Michener C.D., 2007.** The Bees of the World. *The Johns Hopkins University press Baltimore and London* 913p.
- Oldroyd P.B. & Nanork P., 2009.** Conservation of Asian honey bees. *Apidologie*, 40: 296-312.
- Parker R.L., 1926.** The collection and utilization of pollen by the honeybee. *Memoir Cornell University Agricultural Experiment Station* 98: 3-55
- Patiny S., Rasmont P. & Michez D., 2009.** A survey and review of the status of wild bees in the west-Palaearctic region. *Apidologie*, 40: 313-331.
- Percie du Sert P., 2009.** Les pollens apicoles. *Phytothérapie* 7: 75-82.
- Potts S. G., Biesmeijer J. C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. & Kunin W. E., 2010.** Global pollinator declines : trends, impacts and drivers. *Cell press online* 345-353.
- Pouvreau A., 2004.** Les insectes pollinisateurs. *Delachaux et Niestlé, Paris*. 189p.
- Rabie A.L., Wells J.D. and Dent L.K., 1983.** The nitrogen content of pollen protein. *Journal of Apicultural Research* 22 : 119-123.
- Rasheed S.A., Harder L., 1997.** Economic motivation for plant species preferences of pollen-collecting bumble bee. *Ecological Entomology*, 22 : 209-219.
- Rasmont P. & Mersch P., 1988.** Première estimation de la dérive faunique chez les bourdons de la Belgique (Hymenoptera : Apidae). *Annals de la Société royal zoologique Belge*, 2 :141-147.
- Rasmont P., Regali A., 1995.** Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez des colonies orphelines de *Bombus terrestris* (L) (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie* (26) : 273-281.
- Rasmont, P., Ebmer, A., Banaszak, J. & Van Der Zanden, G., 1995.** Hymenoptera Apoidea Gallica. Liste taxonomique des abeilles de France, de Belgique, de Suisse et du Grand-Duché de Luxembourg. *Bulletin de la Société entomologique de France*, 100 (hors série), 1-98.
- Rasmont P., 2003.** Jean-Henri Fabre pourrait-il aujourd'hui observer tout les insectes ? *Actes du colloque International sur l'Entomologie*, pp 209-220.
- Rasmont P., Regali A., Ings T. C., Lognay G., Baudart E., Marelrier 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 for *Bombus terrestris* (hymenoptera, Apidae). *Journal of Economic Entomology* (98) : 656-663.
- Rasmont P., Coppée A., Michez D. & De meulemeester T., 2008.** An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera : Apidae). *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 44 (1) : 243-250/
- Raspé O., Findlay C., Jacquemart A-L., 2000.** *Sorbus aucuparia* L. *Journal of Ecology* 88 : 910-930.

- Régali A., 1995.** *Contribution à l'étude des besoins alimentaires en stéroïdes de Bombus terrestris* (L.). Thèse de doctorat, Université de Mons-Hainaut, Mons, 144 + 29 p.
- Regali, A & P.Rasmont.** 1995. Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez des colonies orphelines de *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 26:273-281
- Ribeiro MF., Duchateau MJ, HHW Velthuis, 1996.** Comparison 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.
- 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 p.
- Röseler PF, Van Honk CGJ, 1990.** Castes and reproduction in bumblebees. *Social insects : an evolutionary approach to castes and reproduction*. Ed. Engels w pp 147-166.
- 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. & Buchmann S.L. (2000)** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil interaction, or phylogeny ? *Ecological Monographs* 70 : 617-643
- Sadasivan & Manickam, 1996.** *Biochemical methods*. Ed. New Age International, 257 pg.
- Schmid-Hempel P., Schmid-Hempel R., Brunner PC, Seeman OD. And Allen GR, 2007.** Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity* 99, 414-422.
- Serra Bonvehi J., Gonello Galindo J., Gomez Pajuelo A. 1986.** Estudio de la composición y características físico-químicas del pollen de abejas. *Alimentaria*, 23 (176) : 63-67.
- Smeets P. & Duchateau M.J., 2003.** Longevity of *Bombus terrestris* workers (hymenoptera : Apidae) in relation to pollen availability, in the absence of foraging. *Apidologie*, 34:333-337.
- Stanley R.G., Linskens H.F., 1974.** *Pollen: Biology, Biochemistry, Management*. First Edition. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Stout J-C., 2000.** Does size matter? Bumblebee behavior and the pollinisation of *Cytisus scoparius* L. (Fabaceae). *Apidologie* 31 :129-139.
- Svoboda J. A., Thomson M., J., Herbert E. W. Jr., Shimanuki H. 1980.** Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet : analysis of prepupal sterols. *Journal of Insects Physiology* 26 : 291-294
- Svoboda J. A., Herbert E. W. Jr., Lusby W.R., Thompson M.J. 1983.** Comparison of sterols of pollens, honeybee workers, and prepupae from field sites. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 1 : 25-31
- Svoboda J.A. & Feldlaufer M.F., 1991.** Neutral sterol metabolism in insects. *Lipids* 26 : 614-618
- Szczesna T., Rybak-Chmielewska H., Chmielewski W.,** Sugar composition of pollen loads harvested at different period of the beekeeping season. *Journal of Apicultural Science* 46 (2) : 107-115.
- Szczesna T., 2006.** Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from selected botanical origins. *Journal of Apicultural Science*. 50 (2) :81-90

**Szczesna T., 2007.** Study on the sugar composition of honeybee-collected pollen. *Journal of Apicultural Science*. 51 (1) : 15-22.

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

**Tautz J., 2009.** *L'étonnante abeille*, ed. de boek, 278 p.

**Vaissière B. & Vinson B., 1994.** Pollen morphology and its effect on pollen collection by honey bees, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera : Apidae), with special reference to upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae). *Granna* 33 : 128-138

**Vanderplanck M., 2009.** *Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires spécialistes sur saule*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons, 148 p.

**Vanderplanck M., Michez D., Vancraenenbroeck S. & Lognay G., 2011.** Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. Sous presse.

**Vereecken N., Schwenninger H., Gogala A. & Roberts S., 2009.** Mise à jour de la distribution de l'abeille du lierre, *Colletes hederæ* Schmidt & Westrich (Hymenoptera, Colletidae) en Europe. *Osmia* 3 : 2-3.

**Wang W., Vignani R., Scali M., Cresti M., 2006.** A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis* 27 : 2782-2786.

**Waters J., Darvill B., Gillian C. L., Goulson D., 2011.** Niche differentiation of a cryptic bumblebee complex in the western Isles of Scotland. *Insect Conservation and Diversity* 4 : 46-52.

**Wilkove DS., Mc Lellan CH., Dobson AP., 1986.** Habitat fragmentation in the temperate zone. *Conservation biology*, pp. 237-256.

**Williams P.H. & Osborne J.L., 2009.** Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie*, 40:367-387.

**Winfree R., Aguilar R., Vasquez D. P., LeBuhn G. & Aizen M. A., 2009.** A meta-analysis of bees' responses to anthropogenic disturbance. *Ecology* 90 (8): 2068-2076.

## 8. ANNEXES

Les différents tableaux des résultats et des détails de la réalisation de candis sont ici présentés. Les données pesées l'ont été à la balance à précision.

**Annexe 1** : Résultats des paramètres mesurés lors de l'élevage des microcolonies de *Bombus terrestris terrestris*

Code alimentaire	A	B	C	D	E	F	G	H	I	Statistique ANOVA / K-W
Nbr. de $\mu$ col.	7	7	6	7	7	7	7	7	7	
Masse des larves/ $\mu$ col. (g)	0.93 $\pm$ 0.65	2.78 $\pm$ 0.99	3.76 $\pm$ 0.81	3.05 $\pm$ 0.67	2.52 $\pm$ 0.6	3.44 $\pm$ 0.63	3.09 $\pm$ 0.62	2.34 $\pm$ 0.35	3.11 $\pm$ 0.48	ANOVA P = 2.04e-08***
Moyenne masse d'une larve / $\mu$ col. (g)	0.12 $\pm$ 0.08	0.29 $\pm$ 0.11	0.31 $\pm$ 0.13	0.36 $\pm$ 0.14	0.29 $\pm$ 0.11	0.26 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.10	0.24 $\pm$ 0.09	0.32 $\pm$ 0.11	K-W P < 2.2e-16***
Nbr. Larve vivante/ $\mu$ col.	7.28 $\pm$ 3.99	10.7 $\pm$ 5.32	13.2 $\pm$ 3.97	9.28 $\pm$ 4.23	9.86 $\pm$ 3.34	13.83 $\pm$ 4.71	10.28 $\pm$ 3.35	10.14 $\pm$ 2.91	10.43 $\pm$ 3.55	ANOVA P > 0.05
Consommation de pollen/ $\mu$ col. 5 J avant la ponte (g)	0.93 $\pm$ 0.14	0.64 $\pm$ 0.13	0.43 $\pm$ 0.15	0.43 $\pm$ 0.12	0.80 $\pm$ 0.18	0.31 $\pm$ 0.15	0.58 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.6	0.4 $\pm$ 0.09	ANOVA P = 1.361e-11***
Consommation de pollen/ $\mu$ col 12 J après la ponte (g)	3.84 $\pm$ 0.61	3.26 $\pm$ 0.89	3.26 $\pm$ 0.37	3.08 $\pm$ 0.34	3.89 $\pm$ 0.63	3.05 $\pm$ 0.44	3.23 $\pm$ 0.48	2.76 $\pm$ 0.6	2.91 $\pm$ 0.29	ANOVA P = 0.004163*
Consommation du sirop/ $\mu$ col. (ml)	65.14 $\pm$ 2.27	59.43 $\pm$ 5.38	53.67 $\pm$ 7.2	60.57 $\pm$ 4.54	63.86 $\pm$ 3.67	56.86 $\pm$ 2.19	53.85 $\pm$ 4.49	63 $\pm$ 5.07	56.14 $\pm$ 1.86	K-W P = 0.0001003***
Mortalité des ouvrières (%)	0	0	8.3	0	0	0	0	0	0	K-W P = 0.01688**
Larves éjectées/ $\mu$ col. (%)	1.92	0	2.47	0	0	4.71	0	1.39	1.35	K-W P > 0.05
Efficacité du pollen (masse larve/pollen consommé)	0.24 $\pm$ 0.18	0.77 $\pm$ 0.22	1.14 $\pm$ 0.13	0.98 $\pm$ 0.14	0.65 $\pm$ 0.11	1.16 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.08	0.92 $\pm$ 0.19	1.06 $\pm$ 0.1	ANOVA P = 1.626e-14***

**Annexe 2** : Consommation (g) du pollen de ciste (témoin -) par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	1	2	3	4	5	6	7
Avant la ponte	0,9939	1,1871	0,8274	0,781	0,872	0,8445	1,0304
Après la ponte	2,9141	3,9171	3,6336	3,7048	3,5138	4,4494	4,7647

**Annexe 3** : Consommation (g) du pollen de saule (témoin +) par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	8	9	10	11	12	13	14
Avant la ponte	0,4632	0,6375	0,7841	0,6198	0,6545	0,4909	0,8151
Après la ponte	3,4988	3,9928	3,3737	3,6551	1,899	2,1587	4,2187

**Annexe 4** : Consommation (g) du pollen de sorbier par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	15	16	17	18	19	20	21
Avant la ponte	0,5451	0,2991	0,5487	0,5154	0,2603	0,5064	0,3759
Après la ponte	3,4081	2,8675	2,7876	3,426	2,5718	3,2607	3,2634

**Annexe 5** : Consommation (g) du pollen de callune par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	22	23	24	25	26	27	28
Avant la ponte	0,822	0,9129	0,799	0,9028	0,4444	0,9952	0,7477
Après la ponte	4,6672	3,9871	3,9576	3,4695	2,821	4,5466	3,8178

**Annexe 6** : Consommation (g) du pollen de genêt par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	29	30	31	32	33	34	35
Avant la ponte	0,2611	0,5347	0,571	0,4202	0,5938	0,4044	0,2241
Après la ponte	3,8464	2,9842	3,3599	/	3,4716	2,8498	3,077

**Annexe 7** : Consommation (g) du pollen mixte sorbier/genêt par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	36	37	38	39	40	41	42
Avant la ponte	0,1596	0,2734	0,252	0,2101	0,2291	0,5601	0,4636
Après la ponte	3,5743	3,4381	2,9973	2,4019	2,9183	3,4015	2,6315

**Annexe 8** : Consommation (g) du pollen mixte callune/genêt par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	43	44	45	46	47	48	49
Avant la ponte	0,6551	0,4252	0,5616	0,6796	0,5668	0,741	0,4688
Après la ponte	2,9084	3,8084	3,4687	3,6536	2,7772	3,4352	2,5653

**Annexe 9** : Consommation (g) du pollen mixte sorbier/callune par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	50	51	52	53	54	55	56
Avant la ponte	0,486	0,6984	0,2691	0,498	0,2617	0,247	0,4132
Après la ponte	/	2,6464	2,2587	3,8295	1,9353	3,0183	2,8764

**Annexe 10** : Consommation (g) du pollen mixte sorbier/callune/genêt par les microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	57	58	59	60	61	62	63
Avant la ponte	0,3781	0,5384	0,3021	0,425	0,2916	0,4526	0,4281
Après la ponte	3,2218	3,1529	2,8361	2,4428	2,9492	2,6455	3,1519

**Annexe 11** : Quantité de sirop consommé (ml) par les microcolonies de *B. t. terrestris*.  
Le résultat marqué d'un « / » n'a pas été relevé car au moins une des ouvrières de la microcolonie est morte lors de l'expérience

<b>pollens</b>	<b>μcolonies</b>													
<b>ciste</b>	1	<b>66</b>	2	<b>62</b>	3	<b>62</b>	4	<b>66</b>	5	<b>68</b>	6	<b>66</b>	7	<b>66</b>
<b>saule</b>	8	<b>62</b>	9	<b>60</b>	10	<b>58</b>	11	<b>58</b>	12	<b>60</b>	13	<b>68</b>	14	<b>50</b>
<b>sorbier</b>	15	<b>64</b>	16	<b>56</b>	17	<b>60</b>	18	<b>54</b>	19	<b>67</b>	20	<b>60</b>	21	<b>63</b>
<b>callune</b>	22	<b>60</b>	23	<b>62</b>	24	<b>66</b>	25	<b>63</b>	26	<b>70</b>	27	<b>66</b>	28	<b>60</b>
<b>genêt</b>	29	<b>52</b>	30	<b>44</b>	31	<b>52</b>	32	/	33	<b>50</b>	34	<b>60</b>	35	<b>64</b>
<b>sorbier/genêt</b>	36	<b>54</b>	37	<b>56</b>	38	<b>56</b>	39	<b>59</b>	40	<b>60</b>	41	<b>58</b>	42	<b>55</b>
<b>Callune/genêt</b>	43	<b>58</b>	44	<b>46</b>	45	<b>52</b>	46	<b>60</b>	47	<b>53</b>	48	<b>54</b>	49	<b>54</b>
<b>Sorbier/callune</b>	50	<b>68</b>	51	<b>56</b>	52	<b>65</b>	53	<b>62</b>	54	<b>70</b>	55	<b>62</b>	56	<b>58</b>
<b>Sorbier/callune /genêt</b>	57	<b>58</b>	58	<b>54</b>	59	<b>56</b>	60	<b>58</b>	61	<b>55</b>	62	<b>54</b>	63	<b>58</b>

**Annexe 12** : Masse des larves (g) nourries au pollen de ciste par microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	1	2	3	4	5	6	7
Masse des larves (g)	0,0691	0,0977	0,1391	0,1399	0,1761	0,0901	0,068
	0,0717	0,597	0,1485	0,1017	0,2345	0,1338	0,1416
		0,1072	0,1524	0,182	0,1263	0,0942	0,1417
		0,1521	0,1366		0,1966	0,06	0,07
		0,1288	0,2218		0,1315	0,0401	0,0862
		0,1211	0,157		0,161		0,0688
		0,058	0,2171		0,1066		0,0627
		0,1292	0,1685		0,1073		0,0479
		0,0944			0,109		0,0476
		0,1433			0,1123		0,0418
		0,069			0,1182		
					0,1439		
Masse moyenne	0,071	0,154	0,168	0,141	0,144	0,084	0,078
$\Sigma$ masse	0.1408	1.6978	1.341	0.4236	1.7233	0.4182	0.7763

**Annexe 13** : Masse des larves (g) nourries au pollen de saule par microcolonies de *B. terrestris*. Nous n'avons pas observé de larves isolées dans la microcolonie 12

Numéro de $\mu$ colonie	8	9	10	11	13	14
Masse des larves (g)	0,1425	0,3703	0,4395	0,4635	0,3548	0,3817
	0,1706	0,3017	0,4024	0,4229	0,4245	0,4111
	0,094	0,2539	0,2309	0,4665		0,3099
	0,1324	0,2665	0,2423	0,4		0,2013
	0,2391	0,302	0,2018	0,3119		0,3708
	0,1069	0,1875	0,3072	0,2435		0,2139
	0,1305	0,2979	0,1894	0,3028		0,2351
	0,0911	0,2259	0,1654	0,4063		0,1918
	0,0628	0,216	0,3349			0,5161
	0,3187	0,1727	0,2744			0,2651
	0,3067	0,1188	0,3156			
	0,1758	0,1465	0,3381			
	0,3521	0,0913				
	0,2645	0,1066				
	0,1666	0,1012				
	0,3219	0,1028				
Masse moyenne	0,192	0,204	0,287	0,377	0,390	0,310
$\Sigma$ masse	3.0762	3.2616	3.4419	3.0174	0.7793	3.0968

**Annexe 14:** Masse des larves (g) nourries au pollen de sorbier par microcolonies de *B. t. terrestris*

Numéro de $\mu$ colonie	15	16	17	18	19	20	21
Masse des larves (g)	0,2574	0,4664	0,5114	0,4837	0,3543	0,4473	0,3576
	0,4722	0,513	0,5186	0,2953	0,3307	0,4056	0,3651
	0,3846	0,5846	0,4975	0,3735	0,4057	0,3707	0,3535
	0,3834	0,5932	0,5501	0,3439	0,2568	0,2225	0,2572
	0,2831	0,5287	0,4317	0,4314	0,2275	0,3134	0,3562
	0,3028		0,3125	0,4749	0,2372	0,4713	0,398
	0,1003			0,4783		0,4414	0,2215
	0,1228			0,4176		0,1908	0,3104
	0,4195			0,4183		0,4275	0,1214
	0,1356					0,191	0,0817
	0,1529						0,1791
	0,1693						0,0689
							0,0776
							0,1485
							0,0484
							0,1652
						0,1454	
Masse moyenne	0,265	0,537	0,470	0,413	0,302	0,348	0,215
$\Sigma$ masse	3.1839	2.6859	2.8218	3.7169	1.8122	3.4815	3.6557

**Annexe 15** : Masse des larves (g) nourries au pollen de callune par microcolonies de *B. t. terrestris*. Suite à un problème de balance, les larves de la microcolonie 23 ne sont pas prises en compte.

Numéro de $\mu$ colonie	22	24	25	26	27	28
Masse des larves (g)	0,5147	0,3935	0,1206	0,4324	0,1982	0,1773
	0,3584	0,3645	0,1373	0,4338	0,2991	0,1268
	0,3245	0,3266	0,1195	0,4798	0,298	0,1019
	0,4116	0,238	0,1234	0,5113	0,1396	0,1569
	0,3932	0,274	0,1388		0,2321	0,0968
	0,3991	0,2709	0,1142		0,2734	0,2623
	0,4474	0,1288	0,2942		0,2201	0,2834
	0,3366		0,1813		0,1436	0,1573
	0,3474		0,3418		0,2852	0,2629
			0,3394		0,2288	0,2957
			0,2593		0,1602	0,1794
			0,3469		0,1659	0,2856
			0,1918			
Masse Moyenne	0,392	0,285	0,208	0,464	0,220	0,199
$\Sigma$ masse	3.5329	1.9963	2.7085	1.8573	2.6442	2.3863

**Annexe 16** : Masse des larves (g) nourries au pollen de genêt par microcolonies de *B. t. terrestris*. La colonie 32 n'est pas prise en compte en raison de la mort d'ouvrières lors du test.

Numéro de μcolonie	29	30	31	33	34	35
Masse des larves (g)	0,1057	0,52	0,1944	0,1286	0,2375	0,0701
	0,1096	0,4515	0,2883	0,1738	0,1849	0,1117
	0,1212	0,5325	0,3029	0,1896	0,3629	0,1769
	0,1363	0,5184	0,4131	0,091	0,4153	0,1317
	0,3952	0,3136	0,2416	0,1466	0,3733	0,1142
	0,3885	0,5166	0,2996	0,1114	0,2629	0,2359
	0,4561		0,3843	0,1088	0,3139	0,218
	0,47885		0,1882	0,2668	0,3383	0,2852
	0,3232		0,3168	0,4498	0,2672	0,1991
	0,4701		0,3342	0,3207	0,3582	0,275
	0,4681		0,184	0,2164	0,2469	0,2929
	0,3933		0,0809	0,4255		0,2515
	0,494		0,2097	0,45		0,2533
	0,4019		0,1149	0,3781		0,1907
	0,4435		0,1026	0,4283		0,2174
			0,36			0,2603
Masse moyenne	0,346	0,475	0,251	0,259	0,305	0,205
Σ masse	5.1855	2.8526	4.0155	3.8854	3.3613	3.2839

**Annexe 17:** Masse des larves (g) nourries au pollen mixte sorbier/genêt par microcolonies de *B. t. terrestris*. Pas de larves isolées dans la microcolonie 37.

Numéro de $\mu$ colonie	36	38	39	40	41	42
Masse des larves (g)	0,2798	0,2516	0,1225	0,3387	0,0784	0,3209
	0,1052	0,4832	0,1845	0,1399	0,0743	0,1816
	0,1863	0,0882	0,1805	0,2371	0,2828	0,3619
	0,3441	0,4638	0,1722	0,0986	0,1499	0,3894
	0,1509	0,2865	0,2894	0,0818	0,0832	0,2895
	0,2429	0,4518	0,3912	0,2445	0,0782	0,1314
	0,1259	0,5088	0,3728	0,3628	0,2977	0,3665
	0,2868		0,337	0,0985	0,0726	0,2008
	0,1935		0,4188	0,1342	0,2111	0,1092
	0,4025		0,3893	0,1063	0,3514	0,1243
	0,3139			0,0776	0,357	0,1558
	0,2457			0,0801	0,3584	0,0933
	0,2284			0,0829	0,3099	0,2729
	0,4583			0,0841	0,3501	0,4129
	0,2975			0,2022	0,3583	
				0,107	0,3498	
				0,4275	0,3833	
				0,3994		
				0,2428		
				0,3087		
M. moyenne	0,257	0,362	0,286	0,193	0,244	0,244
$\Sigma$ masse	3.8617	2.5339	2.8582	3.8547	4.1464	3.4104

**Annexe 18** : Masse des larves (g) nourries au pollen mixte callune/genêt par microcolonies de *B. t. terrestris*.

Numéro de $\mu$ colonie	43	44	45	46	47	48	49
Masse des larves (g)	0,2322	0,197	0,1781	0,383	0,4148	0,2502	0,4163
	0,3949	0,1491	0,2918	0,1151	0,2709	0,304	0,3002
	0,2065	0,1775	0,1828	0,2696	0,2395	0,3957	0,4175
	0,4323	0,1877	0,2008	0,2525	0,2251	0,3484	0,5052
	0,4171	0,2425	0,1195	0,3296	0,3713	0,2391	0,4789
	0,4214	0,3837	0,2002	0,1252	0,4115	0,2072	
	0,4455	0,1664	0,203	0,3813	0,3186	0,2038	
	0,3588	0,4347	0,1937	0,4306	0,403	0,1994	
		0,3605	0,2608	0,3715		0,2036	
		0,2836	0,3633	0,3692		0,3701	
		0,4451	0,3201	0,2997		0,265	
		0,4053	0,2904	0,126			
		0,3461	0,2962	0,3838			
			0,2618				
Moyenne masse	0,363	0,291	0,240	0,295	0,332	0,271	0,424
$\Sigma$ masse	2.9087	3.7792	3.3625	3.8371	2.6547	2.9865	2.1181

**Annexe 19** : Masse des larves (g) nourries au pollen mixte sorbier/callune par microcolonies de *B. t. terrestris*.

Numéro de $\mu$ colonie	50	51	52	53	54	55	56
Masse des larves (g)	0,3808	0,3636	0,1916	0,2713	0,2359	0,3026	0,094
	0,3774	0,4432	0,2533	0,19	0,1978	0,1417	0,1403
	0,2784	0,4857	0,2569	0,1922	0,1954	0,3144	0,2922
	0,3332	0,4233	0,2068	0,1622	0,2406	0,164	0,1191
	0,2531	0,2833	0,2424	0,1471	0,2928	0,3466	0,1801
		0,1329	0,1788	0,153	0,247	0,1839	0,2313
		0,1544	0,2818	0,2139	0,2767	0,2712	0,2213
		0,1078	0,2514	0,0738	0,1538	0,3195	0,1065
			0,2606	0,0966	0,0816	0,3538	0,1551
			0,3152	0,0825	0,1497	0,3537	0,1666
				0,2513	0,1198		0,127
				0,3361	0,1382		0,2826
				0,3402			0,2554
Masse moyenne	0,324	0,299	0,244	0,193	0,194	0,275	0,182
$\Sigma$ masse	1.6229	2.3942	2.4388	2.5102	2.3293	2.7514	2.3715

**Annexe 20** : Masse des larves (g) nourries au pollen mixte sorbier/callune/genêt par microcolonies de *B. t. terrestris*.

Numéro de $\mu$ colonie	57	58	59	60	61	62	63
Masse des larves (g)	0,247	0,3364	0,4966	0,5029	0,2945	0,1721	0,3532
	0,1722	0,1876	0,4186	0,4253	0,216	0,1135	0,186
	0,2702	0,2857	0,4239	0,4577	0,3875	0,2002	0,3553
	0,082	0,253	0,4895	0,4205	0,3195	0,3568	0,4676
	0,1576	0,3548	0,4237	0,4929	0,3106	0,4377	0,4467
	0,1664	0,3194	0,3957		0,3283	0,3638	0,3681
	0,0965	0,3467	0,3397		0,3063	0,1421	0,4014
	0,0824	0,2304			0,3304	0,4313	0,2355
	0,2391	0,3322			0,2863	0,1525	0,2405
	0,1717	0,2654			0,1167	0,4131	0,3308
	0,2205	0,2388			0,3426		
	0,2558	0,2737			0,1185		
	0,3429	0,3198			0,0828		
	0,3478						
	0,3137						
Moyenne Masse	0,211	0,288	0,427	0,460	0,264	0,278	0,338
$\Sigma$ masse	3.1658	3.7439	2.9877	2.2993	3.44	2.7831	3.3851

**Annexe 21** : Efficacité du pollen (masse des larves/pollen consommé) pour les différentes microcolonies.

Pollen	efficacité du pollen
ciste (T-)	0,0483
ciste (T-)	0,4334
ciste (T-)	0,3691
ciste (T-)	0,1143
ciste (T-)	0,4904
ciste (T-)	0,0940
ciste (T-)	0,1629
saule (T+)	0,8792
saule (T+)	0,8169
saule (T+)	1,0202
saule (T+)	0,8255
saule (T+)	/
saule (T+)	0,3610
saule (T+)	0,7341
Sorbier	0,9342
Sorbier	0,9367
Sorbier	1,0123
Sorbier	1,0849
Sorbier	0,7046
Sorbier	1,0677
Sorbier	1,1202
Callune	0,7570
Callune	/
Callune	0,5044
Callune	0,7807
Callune	0,6584
Callune	0,5816
Callune	0,6250
genêt	1,3481
genêt	0,9559
genêt	1,1951
genêt	/
genêt	1,1192
genêt	1,1795
genêt	1,0672
Sorb + genêt	1,0804
Sorb + genêt	/
Sorb + genêt	0,8454
Sorb + genêt	1,1900
Sorb + genêt	1,3209
Sorb + genêt	1,2190
Sorb + genêt	1,2960
Cal + genêt	1,0001
Cal + genêt	0,9923
Cal + genêt	0,9694
Cal + genêt	1,0502
Cal + genêt	0,9559
Cal + genêt	0,8694
Cal + genêt	0,8257
Sorbier+ call	/
Sorbier+ call	0,9047
Sorbier+ call	1,0797
Sorbier+ call	0,6555
Sorbier+ call	1,2036
Sorbier+ call	0,9116
Sorbier+ call	0,8245
Sor+cal+gen	0,9826
Sor+cal+gen	1,1874
Sor+cal+gen	1,0535
Sor+cal+gen	0,9413
Sor+cal+gen	1,1664
Sor+cal+gen	1,0520
Sor+cal+gen	1,0740

**Annexe 22** : Pourcentage d'eau présent dans les pollens scopal d'*Apis mellifera* L.

<b>Pollen</b>	<b>Masse du tube (g)</b>	<b>Masse du tube Eppendorf avec pollen (g)</b>	<b>Masse du tube Eppendorf avec pollen lyophilisé (g)</b>	<b>Quantité d'eau (%)</b>
<b>Genêt</b>	1.3492	1.4804	1.4616	14.3
<b>Sorbier</b>	1.3521	1.5311	1.5064	13.8
<b>Saule</b>	NA	NA	NA	NA
<b>Ciste</b>	1.3418	1.5350	1.5064	14.8
<b>Callune</b>	1.3345	1.8305	1.7646	13.29

**Annexe 23** : Mélange de pollen et de sirop (biogluc pink) pour l'élaboration des candis de la première semaine d'élevage.

<b>Pollen</b>	<b>Quantité de pollen (g)</b>	<b>Quantité de sirop (ml)</b>
<b>Ciste (Témoin -)</b>	15.22	3
<b>Saule (Témoin +)</b>	15.92	2.3
<b>Bruyère</b>	15.10	1.7
<b>Genêt</b>	15.22	1.9
<b>Sorbier</b>	15.01	1.7
<b>Sorbier + Genêt</b>	7.54 + 7.62	1
<b>Sorbier + Bruyère</b>	7.67 + 7.58	0.6
<b>Bruyère + Genêt</b>	7.59 + 7.49	0.6
<b>Genêt + Sorbier + Bruyère</b>	5 + 5.01 + 5.01	0.4

**Annexe 24** : Mélange de pollen et de sirop (biogluc pink) pour l'élaboration des candies de la deuxième semaine d'élevage.

<b>Pollen</b>	<b>Quantité de pollen (g)</b>	<b>Quantité de sirop (ml)</b>
<b>Ciste (Témoin -)</b>	15.53	0.5
<b>Saule (Témoin +)</b>	15.84	1.9
<b>Bruyère</b>	19.09	1.1
<b>Genêt</b>	15.37	1.1
<b>Sorbier</b>	15.22	0.5
<b>Sorbier + Genêt</b>	8.06 + 7.90	0.7
<b>Sorbier + Bruyère</b>	7.58 + 7.52	0.7
<b>Bruyère + Genêt</b>	7.54 + 7.56	0.9
<b>Genêt + Sorbier + Bruyère</b>	5.12 + 5.11 + 5.23	0.9

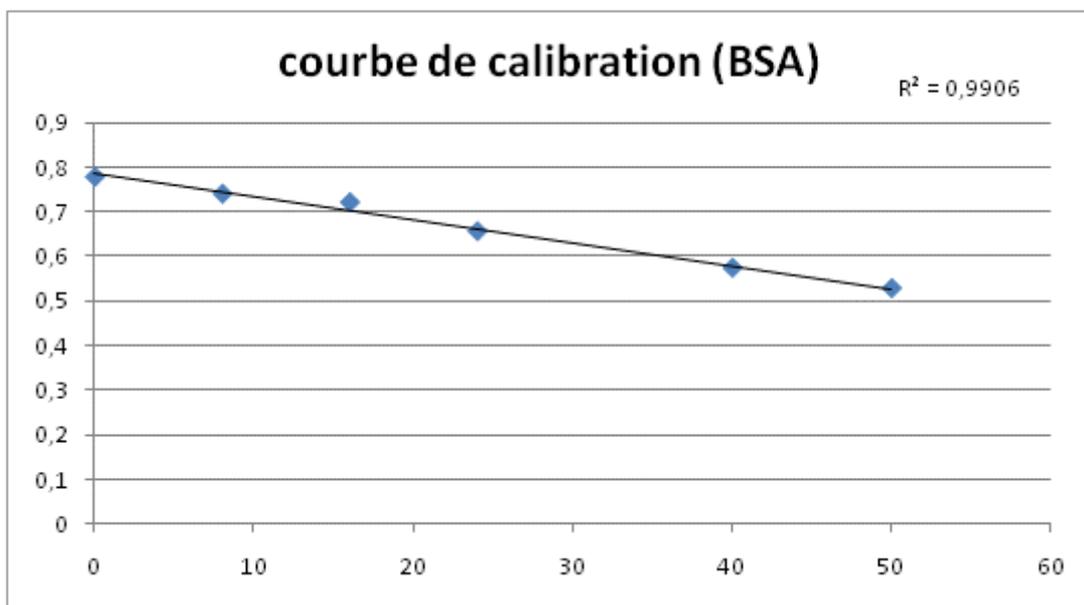
**Annexe 25** : Mélange de pollen et de sirop (biogluc pink) pour l'élaboration des candies de la troisième semaine d'élevage.

<b>Pollen</b>	<b>Quantité de pollen (g)</b>	<b>Quantité de sirop (ml)</b>
<b>Ciste (Témoin -)</b>	18.48	1.6
<b>Saule (Témoin +)</b>	18.10	1.2
<b>Bruyère</b>	15.02	0.9
<b>Genêt</b>	14.98	0.7
<b>Sorbier</b>	15.07	0.6
<b>Sorbier + Genêt</b>	7.18 + 7.37	0.6
<b>Sorbier + Bruyère</b>	6.38 + 5.62	0.4
<b>Bruyère + Genêt</b>	7.46 + 7.62	0.5
<b>Genêt + Sorbier + Bruyère</b>	4.98 + 4.96 + 3.96	0.6

**Annexe 26** : Résultats de l'absorbance du standard (BSA) à différentes concentration.

Protéines (µg)	Absorbance (480 nm)
0	0,778
8	0,74
16	0,721
24	0,656
40	0,574
50	0,528

**Annexe 27** : Courbe de calibration 1 tracée à partir du standard (BSA).



L'équation de la courbe est  $y = -0.0051 x + 0.7845$