

UNIVERSITE DE MONS  
-  
FACULTE DES SCIENCES  
-  
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste  
*Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et  
le genre *Salix* L. (Salicaceae)**

Directeur de mémoire :  
**Dr. Denis Michez**

Mémoire de fin d'Etudes  
présenté par **Azzédine  
Pinczewski**  
En vue de l'obtention du grade  
de **Maître en Biologie des  
Organismes et Ecologie**

Année académique 2011 – 2012

## Remerciements

*Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail.*

*Je remercie le Professeur Pierre RASMONT de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Zoologie. Tout au long de mes études, il m'a enseigné et transmis sa passion pour la zoologie.*

*Je tiens à adresser tous mes remerciements au Docteur Denis MICHEZ pour avoir dirigé ce mémoire. Sa confiance, ses compétences scientifiques et ses conseils m'ont permis de mener à bien ce travail.*

*Je suis très reconnaissante envers le Professeur Pierre RASMONT, du service de Zoologie de l'Université de Mons, le Professeur Igor Eeckhaut, du service du Biologie marine et Biomimétisme de l'Université de Mons, ainsi que le Professeur Anne-Laure JACQUEMART, de la Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale de l'Université catholique de Louvain d'avoir accepté de participer à ce jury.*

*Que soit ici remerciés tous les membres du laboratoire de Zoologie pour leur écoute et leur aide. Merci particulièrement à Monsieur Dimitri EVRARD pour sa disponibilité et son attention à ce que je ne manque jamais de matériel lors de mes analyses.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Maryse VANDERPLANCK. Un énorme merci pour sa présence à mes côtés tout au long de ce travail. Je la remercie pour son aide lors des manipulations, pour son soutien, pour ses encouragements, pour sa patience, pour sa bonne humeur et tous les bons moments partagés.*

*Je remercie le Service de Protéomie et Biochimie des Protéines de m'avoir accueilli pour la réalisation de mes analyses protéiques, et en particulier Jérémy DEROCK pour avoir ajouté de la bonne humeur à ces journées de manipulations.*

*Je remercie également le Service de Chimie Analytique de la Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux pour avoir participé à mes analyses stéroliques, ainsi que le Professeur Bernard WATHELET du Service de Chimie biologique industrielle pour les analyses d'acides aminés.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements à Messieurs Gilles MAHE et Eric DUFRENE pour leur accueil et leur aide lors des récoltes, respectivement en Loire-Atlantique et dans le département de l'Essonne.*

*Je tiens aussi à remercier le Docteur Nicolas VEREECKEN pour les superbes photos qui illustrent ce travail.*

*Un merci à toutes les personnes de ma promo pour ces 5 années passées ensemble et pour tous les souvenirs mémorables partagés lors des excursions. Merci à Gaëtan et Mouad d'avoir partagé ces journées de rédaction avec moi. Un sincère remerciement à Pierre-Laurent de m'avoir accompagné à plusieurs reprises lors des missions de récolte.*

*A ma famille, pour leurs encouragements de tous les jours mais également pour leur aide lors de récoltes.*

# Table des matières

|                                                                        |           |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introduction.....</b>                                            | <b>7</b>  |
| 1.1. Généralités.....                                                  | 7         |
| 1.2. Interactions plantes-abeilles.....                                | 8         |
| 1.2.1. Syndrome de pollinisation .....                                 | 8         |
| 1.2.2. Composition chimique des pollens .....                          | 9         |
| 1.3. Physiologie des abeilles .....                                    | 10        |
| 1.3.1. Métabolisme stérolique.....                                     | 10        |
| 1.3.1.1. Les stérols.....                                              | 10        |
| 1.3.1.2. Les phytostérols .....                                        | 12        |
| 1.3.1.3. Métabolisme stérolique des abeilles .....                     | 13        |
| 1.3.2. Métabolisme protéique .....                                     | 15        |
| 1.4. Spécialisation alimentaire.....                                   | 16        |
| 1.4.1. Adaptations et contraintes à la spécialisation alimentaire..... | 19        |
| 1.4.1.1. Morphologie.....                                              | 19        |
| 1.4.1.2. Ethologie .....                                               | 19        |
| 1.4.1.3. Physiologie .....                                             | 20        |
| 1.5. Modèles biologiques.....                                          | 22        |
| 1.5.1. <i>Andrena vaga</i> (Panzer, 1799).....                         | 22        |
| 1.5.2. Le genre <i>Salix</i> L.....                                    | 28        |
| 1.6. Conservation.....                                                 | 29        |
| 1.7. Objectifs.....                                                    | 31        |
| <b>2. Matériel et méthodes .....</b>                                   | <b>32</b> |
| 2.1. Echantillonnage et conservation du matériel biologique .....      | 32        |
| 2.1.1. Sélection des sites de collecte .....                           | 32        |
| 2.1.2. Description des sites de collecte.....                          | 35        |
| 2.1.2.1. La Grande Bruyère de Blaton (S01).....                        | 35        |
| 2.1.2.2. La forêt domaniale de Flines-les-Mortagne (S02).....          | 36        |
| 2.1.2.3. La forêt de Malassis (S03) .....                              | 37        |
| 2.1.2.4. Le lac des Herbières à Tertre (S04) .....                     | 38        |
| 2.1.2.5. Le village d'Aristi en Grèce (S05).....                       | 39        |
| 2.1.2.6. Le Plateau des Tailles (S06) .....                            | 39        |
| 2.1.2.7. L'étang du Bois-Joalland à Saint-Nazaire (S07) .....          | 41        |
| 2.1.2.8. Le Grand Large de Mons (S08) .....                            | 42        |
| 2.1.2.9. L'ancien fort de Bavière à Koolkerke (S01) .....              | 43        |
| 2.1.3. Pollen.....                                                     | 44        |

|                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.3.1. Pollen floral collecté manuellement .....                       | 44        |
| 2.1.3.2. Pollen collecté par les femelles d'abeilles .....               | 44        |
| 2.1.4. Adultes.....                                                      | 44        |
| 2.2. Analyses palynologiques.....                                        | 45        |
| 2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives.....                       | 47        |
| 2.3.1. Préparation des échantillons .....                                | 47        |
| 2.3.2. Analyse des échantillons.....                                     | 47        |
| 2.4. Analyses protéiques.....                                            | 50        |
| 2.4.1. Préparation des échantillons .....                                | 50        |
| 2.4.2. Analyse des échantillons.....                                     | 50        |
| 2.4.3. Quantification .....                                              | 51        |
| 2.5. Analyses des acides aminés totaux.....                              | 52        |
| 2.5.1. Préparation des échantillons .....                                | 52        |
| 2.5.2. Analyse des échantillons.....                                     | 52        |
| 2.6. Analyses statistiques.....                                          | 53        |
| 2.6.1. Données brutes.....                                               | 53        |
| 2.6.2. Analyse de la variance.....                                       | 53        |
| 2.6.3. Analyses multivariées.....                                        | 54        |
| 2.6.3.1. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) .....      | 54        |
| 2.6.3.2. Analyse multivariée de la variance par test de permutation..... | 55        |
| 2.6.3.3. Analyse des composés indicateurs .....                          | 56        |
| <b>3. Résultats .....</b>                                                | <b>57</b> |
| 3.1. Analyses palynologiques.....                                        | 57        |
| 3.2. Analyses chimiques.....                                             | 58        |
| 3.2.1. Analyses stéroliques.....                                         | 58        |
| 3.2.1.1. Femelles d' <i>Andrena vaga</i> .....                           | 58        |
| 3.2.1.2. Ressources alimentaires .....                                   | 63        |
| 3.2.1.3. Global .....                                                    | 66        |
| 3.2.2. Analyses protéiques .....                                         | 69        |
| 3.2.2.1. Ressources alimentaires .....                                   | 69        |
| 3.2.2.2. Contenu protéique du pollen floral versus pollen scopal .....   | 72        |
| 3.2.3. Analyses des acides aminés totaux.....                            | 72        |
| <b>4. Discussion .....</b>                                               | <b>76</b> |
| 4.1. L'oligolectisme d' <i>Andrena vaga</i> .....                        | 76        |
| 4.2. Qualité nutritionnelle.....                                         | 77        |
| 4.2.1. Variabilité interspécifique .....                                 | 77        |
| 4.2.2. Variabilité intraspécifique .....                                 | 78        |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3. Spécialisation alimentaire et interaction .....     | 80        |
| 4.4. Conservation .....                                  | 82        |
| <b>5. Conclusion .....</b>                               | <b>83</b> |
| <b>6. Perspectives.....</b>                              | <b>84</b> |
| <b>7. Bibliographie .....</b>                            | <b>85</b> |
| <b>8. Annexes .....</b>                                  | <b>94</b> |
| 8.1. Annexe 1 : liste des stations.....                  | 94        |
| 8.2. Annexe 2 : liste des échantillons.....              | 95        |
| 8.3. Annexe 3 : liste des spécimens de collections ..... | 97        |

## 1. Introduction

### 1.1. Généralités

Les abeilles forment un groupe monophylétique de plus de 19.000 espèces décrites dans la superfamille des Apoïdea appartenant elle-même au groupe des Aculéates, au sous-ordre des Apocrites et à l'ordre des Hyménoptères. Outre les abeilles, la superfamille des Apoïdea inclut également les Sphécidae, guêpes solitaires carnivores. Pour cette raison, il est courant de distinguer les apoïdes apiformes (abeilles) des apoïdes sphéciformes (sphécides) (Brothers & Carpenter, 1993).

Actuellement, les abeilles sont divisés en deux groupes et sept familles : les longues langues (familles des Megachilidae et des Apidae) et les langues courtes (familles des Colletidae, Stenotritidae, Andrenidae, Halictidae, et Melittidae) (Danforth *et al.*, 2006). La plupart sont solitaires (plus de la moitié des espèces selon Michener, 2007) et présentent une grande diversité de morphologie, de régime alimentaire et de comportement.

Le cycle de vie d'une abeille sauvage solitaire est très simple. Dès l'éclosion, les mâles patrouillent à la recherche des femelles et l'accouplement a lieu dans l'environnement immédiat de leur naissance. La femelle consacrera ensuite l'essentiel de sa courte existence (quelques semaines au plus) à la confection d'un nid au sein duquel elle accumulera pollen et nectar qui constitueront l'alimentation de base de sa progéniture (Vereecken *et al.*, 2010).

Pour les abeilles, les récompenses florales constituent l'apport alimentaire exclusif. Le pollen est, avec le nectar qui fournit les hydrates de carbone, une ressource majeure pour bon nombre d'insectes. Il contient des éléments variés comme des protéines, des acides aminés, des vitamines, des caroténoïdes et des flavonoïdes (Graikou *et al.*, 2011).

## 1.2. Interactions plantes – abeilles

### 1.2.1. Syndrome de pollinisation

Les abeilles pollinisent près de 80% des angiospermes (Ollerton *et al.*, 2011). Elles visitent les fleurs premièrement pour en prendre le nectar pour se nourrir mais aussi pour collecter le pollen pour leurs larves (Weiner *et al.*, 2010).

Outre son rôle dans l'alimentation des abeilles, le pollen joue un rôle prépondérant dans le processus de reproduction de la plante. Cependant, la quantité de pollen prélevée par l'abeille pour l'approvisionnement de ses cellules larvaires est considérable. Dans une étude menée sur 41 espèces d'abeilles, Müller *et al.* (2006) révèlent que 85% d'entre elles nécessitent l'entièreté du contenu en pollen d'au moins 30 fleurs pour approvisionner une cellule larvaire et certaines espèces ont même besoin du pollen de plus de mille fleurs pour élever une larve.

De plus, l'efficacité de la récolte est telle que l'abeille est capable de soutirer l'entièreté du pollen d'une fleur, ne laissant (quasi) rien pour la pollinisation. Après chaque visite florale, l'abeille se brosse soigneusement le corps et transfère les grains de pollen dans des brosses de récoltes spécialisées (scopae) les rendant généralement inaccessibles pour la pollinisation (Westerkamp, 1996). Ces énormes quantités de pollen collectées par les abeilles compromettent le succès reproducteur de la plante engendrant une forte compétition entre l'insecte et son hôte pour le pollen.

De ce fait, les interactions plantes-pollinisateurs ne peuvent être considérées comme un simple mutualisme, mais plutôt interprétées comme une « exploitation mutuelle balancée » (Westerkamp, 1996) où les fleurs doivent continuellement faire face au dilemme d'attirer les abeilles pour la pollinisation, d'une part, et de restreindre les pertes de pollen, d'autre part. Les plantes doivent donc minimiser les pertes de pollen en restreignant le spectre des visiteurs palynophages. Plusieurs traits morphologiques, comme l'hétéranthérie, la dissimulation des anthères (Thorp, 2000) ou du pollen ou encore la libération progressive de pollen (Schlindwein *et al.*, 2005), sont actuellement interprétés comme des adaptations contre une exploitation excessive du pollen par les abeilles et limitant donc l'accès à une guilda de pollinisateurs spécialisés.

Afin d'empêcher cette récolte excessive, la plante peut aussi effectuer une sélection en agissant sur la composition de son pollen, que ce soit sur sa toxicité ou sur sa valeur nutritionnelle (Praz *et al.*, 2008). Plusieurs espèces de plantes contiennent des composés secondaires dans le nectar et le pollen qui peuvent être toxiques pour les pollinisateurs (Jürgen & Dötterl, 2004). La fonction des composés secondaires dans le nectar a été expliquée par plusieurs hypothèses, comme l'encouragement des pollinisateurs spécialisés, l'évitement des voleurs de nectar, la protection des risques abiotiques comme les rayons UV ou la prévention de la dégradation microbienne du nectar (Adler, 2000 ; Marcolino de Assis Junior *et al.*, 2011 ; Nyman *et al.*, 2005). Donc, la présence de composés secondaires dans les grains de pollen pourrait être une stratégie visant à limiter la collecte de pollen par les abeilles (Marcolino de Assis Junior *et al.*, 2011).

### 1.2.2. Composition chimique des pollens

Divers auteurs se sont penchés sur la chimie du pollen et la concentration d'éléments nutritifs dans les grains de pollen (e.g. Barbier 1970, Stanley & Linskens 1974, Solberg & Remedios 1980, Rasmont *et al.*, 2005). Les nutriments comprennent des protéines, de l'azote, des acides aminés, de l'amidon, des stérols et des lipides. La plupart des analyses sont basées sur peu de taxons. Les analyses chimiques de pollen sont difficiles car la plupart des techniques analytiques requièrent plus de pollen que ce qui peut être facilement récolté à la main. La plupart des analyses chimiques de pollen sont donc basées sur du pollen collecté par les abeilles. Cependant, celles-ci rajoutent du nectar et donc des sucres réducteurs au pollen. Ainsi, l'incertitude est grande pour la majorité des valeurs déclarées (Roulston & Cane, 2000).

La valeur nutritive du pollen varie en fonction de la plante et est généralement estimé approximativement par la teneur en protéines brutes (Tasei & Aupinel, 2008). Les plantes diffèrent fortement dans leur composition en acides aminés, spécialement dans les proportions en acides aminés libres ou liés. Les espèces de plantes étroitement apparentées montrent une composition chimique du pollen similaire, suggérant que les profils sont un trait hautement conservé. Des différences au niveau de la composition sont plus évidentes entre les familles et les ordres (Weiner *et al.*, 2010).

Le pollen des plantes les plus pauvres en protéines sont les gymnospermes anémophiles comme les Cupressaceae et les Pinaceae. Bien que beaucoup de pollens anémophiles soient pauvres en protéines, les changements évolutifs en faveur de l'anémophilie ne sont pas statistiquement associés à une diminution de la concentration en protéines. Roulston & Cane (2000) n'ont trouvé aucune preuve que les espèces d'abeilles collectent préférentiellement du pollen qui est particulièrement riche en protéines.

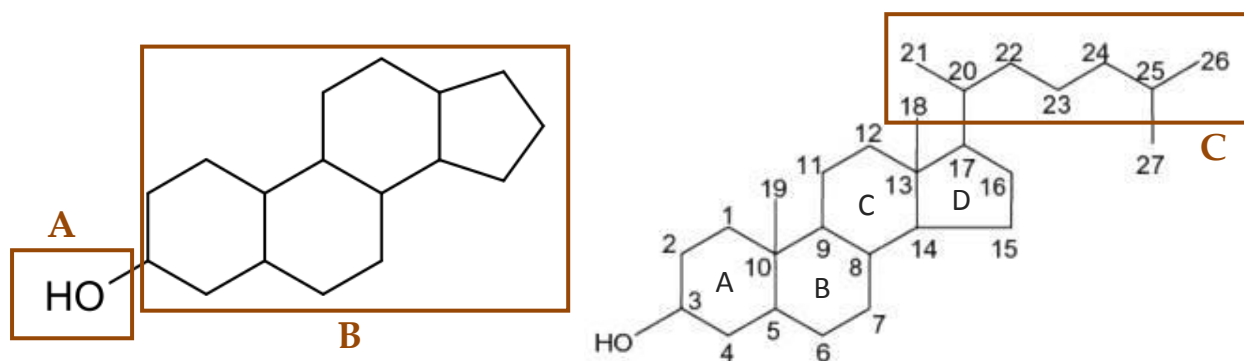
Il est possible que les profils stéroliques des plantes reflètent des adaptations aux conditions locales abiotiques. Par exemple, les Chenopodiaceae poussant dans les prairies alcalines et les habitats salins possèdent une haute concentration en  $\Delta^7$ -desmethylsterols (Behmer & Nes, 2003).

### 1.3. Physiologie des abeilles

#### 1.3.1. Métabolisme stérolique

##### 1.3.1.1. Les stérols

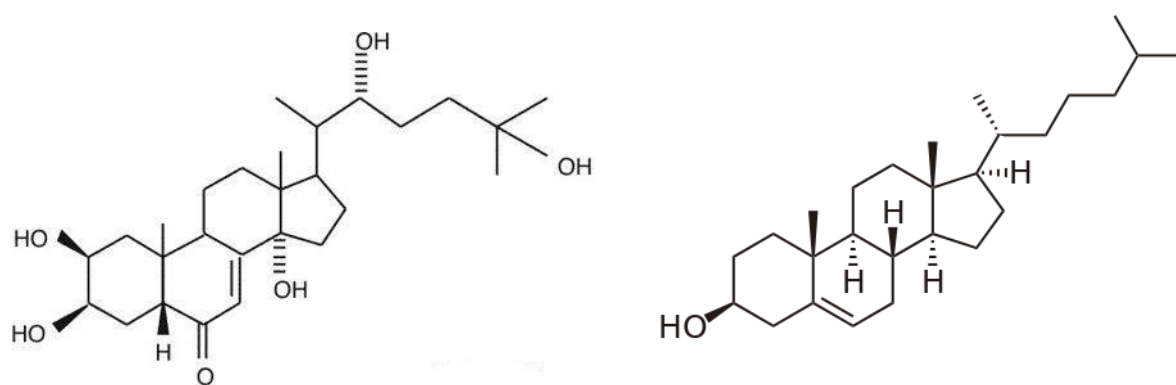
Les stérols sont des lipides, considérés comme une sous-classe de stéroïdes. Ils sont caractérisés par trois domaines : un groupe hydroxyle sur le carbone 3 (A), un ensemble d'anneaux tétracycliques (noyau stérane) (B), et une chaîne latérale de 8 à 10 atomes de carbone (C). Les éléments polaires (A) et non-polaires (B et C) expliquent la nature amphipatique de la molécule (Behmer & Nes, 2003) (Fig. 1).



**Figure 1 :** A gauche, noyau de base des stérols (© Roland Mattern). A droite, structure principale des stérols. Les atomes de carbone sont numérotés (source : [www.cyberlipid.org](http://www.cyberlipid.org)).

Les stérols sont des constituants des matières grasses animales et végétales assurant de nombreuses fonctions biologiques et physiologiques.

Le cholestérol est le principal stérol d'origine animale. C'est un monoalcool secondaire, polycyclique et insaturé de formule brute  $C_{27}H_{46}OH$ . Il dérive du noyau stérane par substitution de groupements méthyle (en 10 et 13), d'un hydroxyle en 3, d'une double liaison dans le cycle B en 5-6 et enfin d'une chaîne latérale à 8 atomes de carbones en 17 (Fig. 2). Il est vital pour le fonctionnement cellulaire et est un précurseur de vitamines et d'hormones stéroïdiennes liposolubles. Il intervient chez les insectes dans la synthèse de l'hormone de mue ou ecdysone, elle aussi à 27 atomes de carbone (Debaille, 1995). C'est aussi un constituant indispensable de la structure cellulaire de l'insecte (Hügel, 1965).



**Figure 2 :** A gauche, molécule d'ecdysone (source : [www.ecdysbase.org](http://www.ecdysbase.org)). A droite, molécule de cholestérol (source : [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)).

Les protéines Hedgehog sont impliquées dans le développement embryonnaire, et jouent un rôle important dans la mise en place du plan de l'organisme. Ce sont des protéines cruciales pour le développement embryonnaire tant chez les vertébrés que chez les non vertébrés. La protéine Hedgehog est la seule connue pour être liée de façon covalente au cholestérol. Le taux de cholestérol modifie donc de façon covalente ces protéines, ce qui affecte la morphologie (Behmer & Nes, 2003).

### 1.3.1.2. Les phytostérols

Très peu de plantes synthétisent du cholestérol mais elles contiennent des phytostérols, naturellement présents dans leur fraction lipidique. Par rapport au cholestérol ( $C_{27}H_{45}OH$ ), les phytostérols présentent un ou deux substituants carbonés supplémentaires au niveau du carbone 24 (Fig. 1).

Au moins 100 stérols différents ont été identifiés dans les plantes (Akihisa *et al.*, 1991). Le  $\Delta^5$ -sitostérol et le stigmastérol sont les stérols les plus communs et les plus abondants chez les angiospermes, mais beaucoup d'espèces contiennent du campestérol et du 24-dihydrobassicatérol. Les phytostérols diffèrent entre eux principalement par le nombre et la position des insaturations au sein du noyau et de la chaîne latérale ainsi que par l'ampleur du groupement alkyl en  $C_{24}$  (Behmer & Nes, 2003).

Le stéroïde érythrodiol,  $C_{30}H_{50}O_2$ , (Fig. 3) a été identifié pour la première fois dans le profil stérolique du pollen de *Salix caprea* (Vanderplanck, 2009). Jusqu'à présent, dans la littérature (Juan *et al.*, 2008 ; Sánchez Casas *et al.*, 2004), il n'avait été recensé que chez *Olea europa*, où il joue le rôle de précurseur des acides triterpéniques pentacycliques comme l'acide oléanolique. L'érythrodiol est aussi connu pour exercer une activité antiproliférative et pro-apoptotique (Juan *et al.*, 2008).

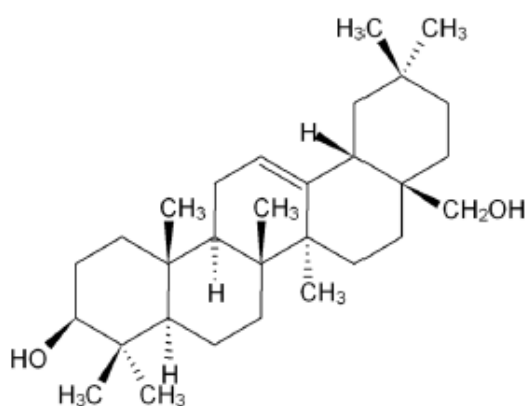


Figure 3 : Molécule d'érythrodiol (d'après Juan *et al.*, 2008)

### 1.3.1.3. Métabolisme stérolique des abeilles

A l'heure actuelle, il est admis que les stérols jouent trois rôles dans la physiologie des insectes : (i) comme composant essentiel des membranes cellulaires, (ii) comme précurseur d'hormones de mue, ecdystéroïdes, et (iii) comme molécule signal liée au groupe de protéines *Hedgehog* touchant le développement (Behmer & Nes, 2003).

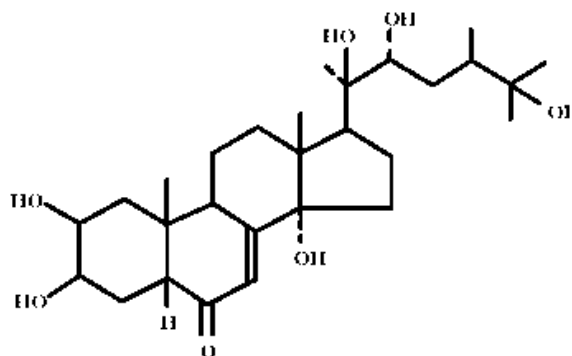
Contrairement à la plupart des animaux, les insectes n'ont pas la capacité d'effectuer la biosynthèse des stérols. Ils doivent donc les acquérir de part leur alimentation (Behmer & Nes, 2003). Herbert *et al.* (1980) a démontré que le 24-méthylène-cholestérol et le cholestérol sont facilement utilisables par les abeilles, contrairement au campestérol, au stigmastérol et au  $\beta$ -sitostérol.

Chez les insectes, trois stratégies sont possibles pour modifier le squelette carboné des phytostérols.

- Les insectes carnassiers ou nécrophages trouvent le cholestérol tel quel dans leur alimentation et peuvent donc synthétiser directement l'ecdysone à partir de ce cholestérol (Debaille, 1995).
- Les végétaux ne contenant pas de cholestérol, les insectes phytophages, qui ne trouvent dans leur diète que des phytostérols à 28 ou 29 atomes de carbone, sont obligés de modifier le squelette carboné de ces molécules, pour leur enlever un ou deux atomes de carbone, de façon à obtenir le précurseur nécessaire à l'ecdysone. Cette réaction d'enlèvement d'un atome de carbone est la désalkylation. Les voies métaboliques utilisées pour passer des phytostérols C<sub>28</sub> et C<sub>29</sub> aux stérols C<sub>27</sub> et au cholestérol sont très diversifiées (Svoboda *et al.*, 1980 ; Herbert *et al.*, 1980).

La capacité de désalkylation est présente chez les membres primitifs de l'ordre des Hyménoptères, des Lépidoptères et des Diptères. Jusqu'à présent, il semble que cette capacité a été maintenue chez les Lépidoptères, et non maintenue chez les Hyménoptères et Diptères plus évolués (Behmer & Nes, 2003).

- Certains insectes phytophages sont incapables de réaliser la désalkylation, comme l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.) (Svoboda *et al.* 1983) ou comme en général les Apocrites au sein des Hyménoptères (Behmer & Nes, 2003). Ces insectes utilisent un phytostérol particulier comme précurseur à l'hormone de mue. Par exemple, *Apis mellifera* utilise comme hormone de mue non pas une ecdysone (C<sub>27</sub>) mais le makistéron A (C<sub>28</sub>) (Fig. 4) (Debaille, 1995). Il semblerait que le 24-méthylène cholestérol serait directement utilisé par l'insecte au même titre que le cholestérol (Hügel, 1965).



**Figure 4 :** Molécule de makistéron A (d'après Svoboda *et al.*, 1991)

La composition en stérols d'un insecte dépend aussi de son régime alimentaire et pour les insectes phytophages, un mélange de cholestérol et de 24-alkyl stérols est commun (95% des stérols totaux). Le 24-méthylène cholestérol est le stérol tissulaire dominant chez les abeilles, suivi par d'autres phytostérols qui sont déterminés par la composition en stérols de la plante hôte (Behmer & Nes, 2003).

Bien que certaines espèces d'insectes aient des exigences structurelles rigides pour les stérols, d'autres semblent être en mesure d'utiliser une variété de différents stérols dans différentes conditions environnementales. Habituellement, les termes spécialistes et généralistes réfèrent à la gamme d'hôtes d'un insecte herbivore, mais il pourrait aussi être utilisé pour décrire les capacités d'utilisation des stérols d'un insecte. Cependant, l'utilisation large des stérols et des hôtes n'est pas toujours corrélée. (Behmer & Nes, 2003).

Les insectes ne possédant pas de sels biliaires, les stérols sont absorbés passivement dans les membranes du tissu intestinal. Les insectes phytophages n'absorbent donc pas sélectivement les stérols utilisables par rapport aux stérols non-utilisables. Les stérols non-utilisables peuvent affecter la production de cholestérol, probablement en réduisant l'absorption des stérols qui servent de précurseurs pour celui-ci. En général, il semble que les quantités de stérols absorbés, ainsi que la quantité de cholestérol produite, sont directement liés à la proportion des stérols utilisables et non-utilisables dans l'alimentation (Behmer & Nes, 2003).

### 1.3.2. Métabolisme protéique

Comme les abeilles comptent exclusivement sur les récompenses florales comme source alimentaire, le pollen est la ressource de protéine principale utilisée pour l'adulte et le développement de larves (Michener 2007). Il a été démontré que le contenu alimentaire en protéines est crucial pour la reproduction, la croissance et la longévité des abeilles et autres insectes (Roulston & Cane, 2000). Cependant, la qualité et la quantité de protéines du pollen semblent fortement variables parmi les différentes espèces de plantes. La proportion en protéines varie de 2.5% à 61% de protéines en masse sèche (Bushman, 1986) et le taux d'acides aminés liés aux protéines varie de 3.5% à 24.9% (Weiner *et al.*, 2010).

Le pollen n'est donc pas une ressource universellement exploitable. Les abeilles ne se nourrissent pas de quantités égales en pollens selon la concentration en protéines. En effet, la concentration du pollen en protéines peut influencer la fréquence des voyages de collectes que l'abeille doit effectuer pour fournir à sa progéniture du pollen suffisant pour répondre à leurs besoins alimentaires en protéines (Roulston & Cane, 2000). En parallèle, les abeilles récoltent préférentiellement du nectar contenant des acides aminés (Alm *et al.*, 1990).

La valeur nutritionnelle du pollen a été jugée surtout sur son contenu en protéines brutes (Day *et al.*, 1990). Cependant, le contenu protéique n'est pas suffisant pour évaluer la valeur nutritionnelle, en partie parce qu'il ne reflète pas en juste proportion la disponibilité des acides aminés. L'analyse des protéines est donc indivisible de l'analyse des acides aminés totaux dans l'étude nutritionnelle pour détecter un manque ou un déséquilibre en acides aminés essentiels (Vanderplanck *et al.*, 2012).

De Groot (1953) a déterminé que la composition idéale du pollen en acides aminés essentiels pour l'abeille domestique (*Apis mellifera*) était de 11% en arginine, 5% en histidine, 14% en isoleucine, 16% en leucine, 11% en lysine, 5% en méthionine, 9% en phénylalanine, 11% en thréonine, 4% en tryptophane et 14% en valine. Cet équilibre était très semblable à ceux d'autres animaux (Nation, 2002) et ainsi, il a été assumé qu'il ne varie pas significativement entre les abeilles.

La plupart des espèces de plantes contiennent le spectre total des acides aminés essentiels, bien que certains en extrêmement petites quantités. Cependant, la forte limitation quantitative du tryptophane et occasionnellement de la méthionine est évidente, et cette limitation peut être cruciale pour le développement des abeilles et autres insectes se nourrissant de pollen. Les plantes abritant les oligolectiques contiennent une concentration en acides aminés essentiels inférieure et dévient fortement de la composition idéale en acides aminés essentiels déterminée pour l'abeille domestique. La proportion en isoleucine est significativement plus faible mais la proportion en histidine est plus grande. Cependant, en comparant au niveau de la famille, le pollen collecté par les oligolectes n'est ni plus ni moins nutritif que les autres pollens (Weiner *et al.*, 2010).

## 1.4. Spécialisation alimentaire

Robertson (1925) a été un des premiers à reconnaître que les abeilles ne collectent pas le pollen des fleurs aléatoirement mais que quelques espèces démontrent une spécificité florale en collectant le pollen sur un nombre limité de taxon de plantes. Il a introduit les termes monolectisme, oligolectisme et polylectisme pour distinguer respectivement, les spécialistes des généralistes. Cette classification ne reflète pas adéquatement les relations complexes entre les abeilles et leurs hôtes et a été mise à jour par Cane & Sipes (2006), et récemment modifiée par Müller & Kuhlmann (2008) (Murray *et al.*, 2009). Les termes utilisés au long de ce travail se référeront à la classification de Müller & Kuhlmann (2008 ; *Table 1*).

**Table 1 :** Classification des différentes catégories de spécialisation alimentaire, d'après Müller & Kuhlmann (2008). s.l. = sensu lato, s.s. = sensu stricto.

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

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

L'oligolectisme est fréquent chez certains genres ou familles d'abeilles solitaires, comme le genre *Andrena* (Waser & Ollerton, 2006).

Jusqu'à maintenant, peu de choses sont connues au sujet du signal utilisé par les abeilles oligolectiques pour trouver leurs plantes hôtes (Dötterl *et al.*, 2005). Nos connaissances sur les différents aspects du comportement des pollinisateurs, comme les stratégies de recherche de nourriture ou des distances parcourues, des capacités cognitives ou d'apprentissage, et la constance florale restent rudimentaires (Mayer *et al.*, 2011).

Couramment, il a été supposé que le polylectisme était l'état ancestral chez les abeilles (Michener, 1954). Mais récemment, des preuves supplémentaires suggèrent que dans la majorité des lignées d'abeilles, les espèces généralistes ont évolué à partir d'ancêtres oligolectiques (Danforth *et al.*, 2006).

Les avantages de l'oligolectisme restent en grande partie inconnus, bien que plusieurs hypothèses aient été avancées, surtout une plus grande efficacité des abeilles spécialisées visitant leurs plantes hôtes spécifiques à travers une adaptation évolutive (Strickler, 1979 ; Müller *et al.*, 2006). Par ailleurs, la spécialisation sur une plante hôte permettrait de réduire la compétition interspécifique (Thorp, 1969). Comme toutes les espèces de plantes visitées par les oligolectiques sont généralement visitées par les polylectiques, l'hypothèse de la compétition semble être peu probable (Minckley & Roulston, 2006). Cependant, la compétition peut être accomplie en se spécialisant sur des composés toxiques contenus dans le pollen ou étant moins nutritifs et donc visitées moins fréquemment ou par moins d'espèces (Dötterl *et al.*, 2005).

Une plus haute efficacité en récolte de pollen peut être accomplie à travers une adaptation comportementale et morphologique (Müller & Bansac, 2004). Les contraintes évolutives ont pu jouer un rôle majeur dans le choix de la plante hôte des oligolectes (Sedivy *et al.*, 2008).

### **1.4.1. Adaptations et contraintes à la spécialisation alimentaire**

#### **1.4.1.1. Morphologie**

Bien que certaines femelles transportent le pollen à l'intérieur de leur tube digestif (Thorp, 1979), la plupart possèdent des dispositifs externes pour le transport du pollen ainsi que des structures particulières leur permettant de broser leur corps pour accumuler le pollen dans les scopae. Plusieurs études ont montré que les espèces oligolectiques arborent parfois des adaptations morphologiques pour la récolte de pollen (Thorp, 1979, 2000). Ces adaptations morphologiques sont observées chez les abeilles qui récoltent du pollen difficilement accessible (Müller *et al.*, 2006) ou de grande taille (Pasteels & Pasteels, 1979 ; Thorp, 1979).

Ainsi, certaines abeilles possèdent des poils en crochet sur le proboscis ou les pattes antérieures afin de faciliter la récolte de pollen des fleurs aux anthères dissimulées (Thorp, 1979 ; Harder & Barrett, 1993 ; Müller, 1995, Thorp, 2000). D'autres espèces présentent une pilosité localement plus abondante, habituellement sur la tête, qui aide à accumuler le pollen floral, en particulier celui provenant des fleurs nototribes (Thorp, 2000).

#### **1.4.1.2. Ethologie**

Les adaptations éthologiques à la spécialisation alimentaire sont multiples.

Certaines abeilles arborent des séquences de mouvements particulières telles que la vibration des fleurs (« buzzing ») dans le but d'augmenter la quantité de pollen prélevée, en particulier dans le cas des plantes possédant des anthères à déhiscence poricide (Müller *et al.*, 1997).

Il est également primordial que l'émergence des imagos et la période de floraison de la plante hôte soient synchronisées (Michez *et al.*, 2008). Tout changement phénologique doit être corrélé avec un changement d'hôte(s) (Larkin *et al.*, 2008). Le pollinisateur oligolectique se doit ainsi de rester en diapause lorsque sa plante hôte n'est pas en fleur (Waser & Ollerton, 2006).

L'orientation visuelle, pour certains groupes d'insectes, joue un rôle important lors du choix d'un hôte dans l'environnement immédiat. Des phénomènes comportementaux comme la phototaxie et la géotaxie sont utiles dans la reconnaissance à courte distance de la plante hôte (Nicole, 2002). Par exemple, l'abeille domestique, *Apis mellifera* L., est capable de discriminer morphologiquement les inflorescences de *Lavandula stoechas*. Elle choisit dans une plus grande proportion les grosses inflorescences, donc celles qui contiennent plus de fleurs et par le fait même une plus grande quantité de nectar (Duffield *et al.*, 1993).

Pour localiser un hôte sur de très longues distances, la perception de substances chimiques est nécessaire. En plus de contenir les nutriments fondamentaux, la nourriture des insectes doit contenir des stimuli chimiques pour assurer le succès de l'alimentation. Ces stimuli chimiques, dont plus de 100 000 sont connus à ce jour, sont des composées secondaires contenus dans les plantes (Nicole, 2002).

La perception de ces substances chimiques se fait par le biais des antennes qui possèdent des cellules sensorielles directement reliées au système nerveux central de l'abeille. Certaines espèces sont capables de détecter un signal chimique jusqu'à 100m de distance (Nicole, 2002).

#### 1.4.1.3. Physiologie

Les différences de performances (croissance larvaire, développement de colonie) de certaines abeilles sur les différents types de pollen suggèrent que tous les pollens ne se valent pas chimiquement (Larkin *et al.*, 2008).

Praz *et al.* (2008) ont démontré que plusieurs espèces d'abeilles spécialistes ne se développent pas sur du pollen provenant d'une plante non-hôte, indiquant que le pollen de quelques taxons de plantes, comme par exemple les Asteraceae, possèdent des propriétés défavorables ou protectrices qui rendent la digestion difficile. Cela suggère que la digestion du pollen par les abeilles pourrait, en général, exiger des adaptations physiologiques particulières pour faire face aux composés secondaires toxiques de leurs hôtes (Praz *et al.*, 2008 ; Murray *et al.*, 2009).

Les plantes hôtes des oligolectes montrent une concentration relative plus faible en acides aminés essentiels par rapport aux autres plantes. Il est donc possible que les abeilles oligolectiques soient mieux adaptées à une qualité nutritive plus faible de leur plante hôte (Weiner *et al.*, 2010). De plus, certaines preuves suggèrent que les oligolectes sont physiologiquement mieux adaptés à la digestion du pollen de leur plante hôte et peuvent absorber les éléments nutritifs présents dans le pollen de leur source de nourriture limitée plus efficacement que les autres abeilles (Praz *et al.*, 2008 ; Weiner *et al.*, 2010).

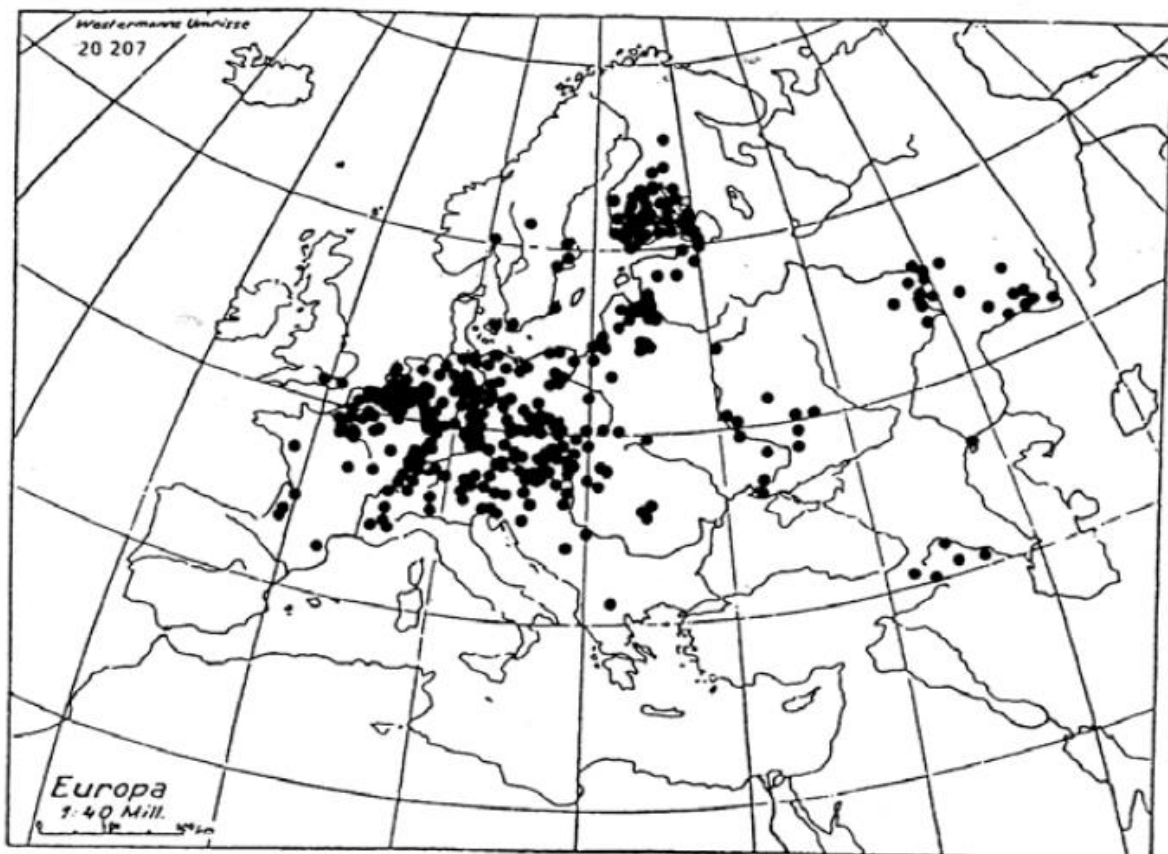
Il semble donc que l'adaptation des oligolectiques se traduise également au niveau physiologique.

Enfin, il paraît hautement improbable que les exigences en stérols pourraient influencer le comportement de sélection alimentaire des insectes prédateurs puisque pour ceux-ci le cholestérol n'est jamais un élément nutritif limitant. Par contre, les insectes spécialistes herbivores semblent être spécifiquement adaptés aux profils, concentration et distribution spatiale des stérols trouvés dans leurs plantes-hôtes. D'autre part, il a été suggéré que les contraintes sur la capacité métabolique des stérols peuvent être un facteur contribuant au comportement conduisant au mélange de nourriture chez les insectes phytophages généralistes (Behmer & Nes, 2003)

## 1.5. Modèles biologiques

### 1.5.1. *Andrena vaga* (Panzer, 1799)

Le genre *Andrena* appartient à la famille des Andrenidae et au groupe des abeilles à langue courte. Il compte environ 2333 espèces décrites (Michener, 2007), dont le quart est recensé en Europe (Patiny *et al.*, 2009). *Andrena vaga* est une andrène printanière univoltine dont la période de vol s'étale de mars à mai. S'agissant d'une espèce protandre, les mâles, nettement plus petits et caractérisés par une barbe faciale blanche (Fig. 6), apparaissent en mars avant les femelles. Ils volent en nuées au ras du sol, recherchant des partenaires afin de s'accoupler. Les femelles, mesurant de 13 à 14 mm, émergent plus tardivement. De couleur noire, l'andrène vague présente un abdomen brillant ainsi qu'un thorax revêtu de poils gris pâle (Bellmann, 1999). Sa distribution s'étend sur une bonne partie de la région ouest-paléarctique (Bischoff *et al.*, 2003 ; Gusenleitner & Schwarz, 2002 ; Fig. 5).



**Figure 5 :** Distribution en région ouest-paléarctique d'*Andrena vaga* (Panzer), d'après Gusenleitner & Schwarz, 2002



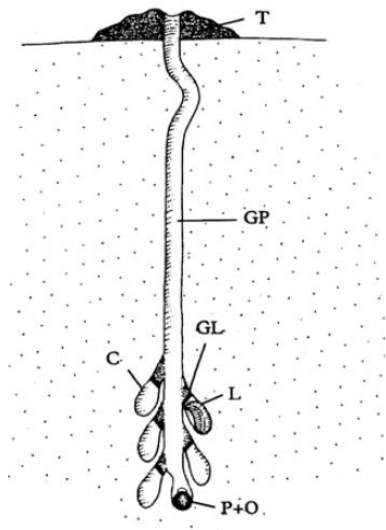
**Figure 6 :** Mâle d'*Andrena vaga* et sa barbe faciale caractéristique (Photo N. Vereecken)

*Andrena vaga* est une espèce psammophile. Elle creuse son nid dans les terrains sablonneux des coteaux bien exposés au soleil. Bien que solitaire, les nids sont généralement regroupés en grand nombre sur des espaces restreints, chaque femelle s'occupant de son nid (Fig. 7).



**Figure 7 :** Agglomération de nids d'*Andrena vaga* (Photo N. Vereecken)

Le nid comprend une galerie, de 15 à 40 cm, qui s'enfonce plus ou moins obliquement dans la terre et qui se termine en se ramifiant en plusieurs galeries latérales, chacune s'achevant par une loge sphérique (Fig. 8 ; Bellmann, 1999 ; Pouvreau, 2004 ; Vereecken *et al.*, 2006).

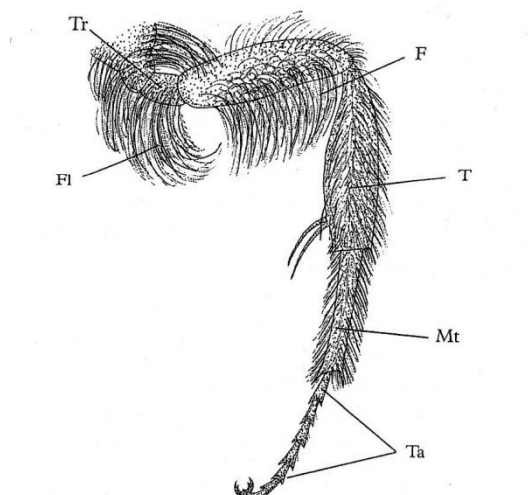


**Figure 8 :** Nid d'*Andrena vaga*.

C: cellule ; GL: galerie latérale ; GP: galerie principale ; L: larve ; P+O: pain de pollen avec un oeuf ; T: tumulus (d'après Pouvreau, 2004).

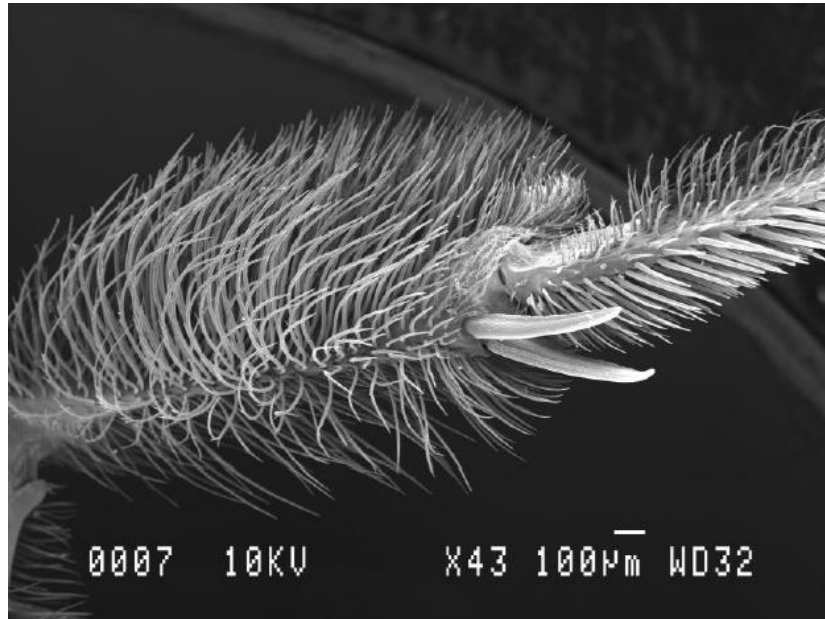
Les loges larvaires sphériques abritent une pâte nourricière composée d'un mélange de nectar et de pollen sur laquelle elle pond un œuf (Vanderplanck *et al.*, 2009).

Le pollen est transporté grâce aux pattes postérieures et au métathorax. Les tibias postérieurs sont recouverts de poils lisses et ramifiés, formant une épaisse brosse à pollen. Les fémurs postérieurs présentent une sorte de brosse entourée de franges de poils ramifiés. Sur les segments de la patte appelés trochanters, de longs poils plumeux recourbés vers l'arrière constituent le flocus. Cette touffe de poils piège le pollen et contribue à le maintenir sur les corbeilles des fémurs (Pouvreau, 2004, Fig. 9 et Fig. 10).



**Figure 9 :** Patte postérieure d'androne

F : fémur ; Fl : flocus ; Mt : métatarse ; T : tibia ; Ta : tarse ; Tr : trochanter (d'après Pouvreau, 2004)



**Figure 10 :** Tibia postérieur d'*Andrena vaga* (G. Carreaux)

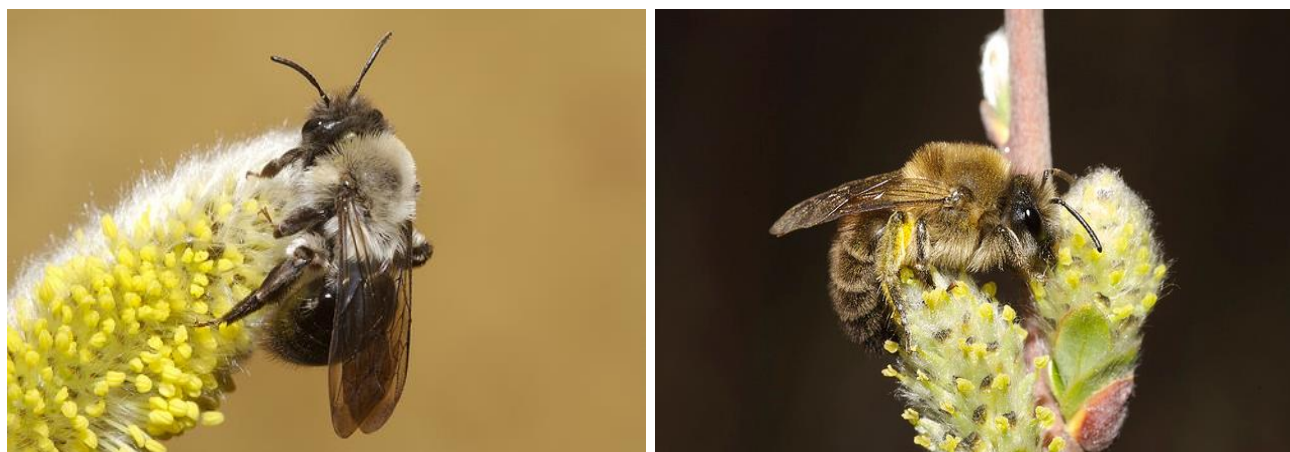


**Figure 11 :** Femelle d'*Andrena vaga* avec charges scopales à l'entrée du nid (Photo N. Vereecken)

Vers avril-mai, les adultes cessent leurs activités et meurent avant que leur progéniture ne parvienne à l'état adulte (Bellmann, 1999 ; Pouvreau, 2004). Durant la même période, les larves se développent rapidement puis restent quelques temps en diapause. C'est en plein été qu'a lieu la nymphose, suivie de la mue en insecte parfait à la fin de l'été (Bellmann, 1999). Les imagos passent alors tout l'hiver dans leurs cellules protectrices pour n'émerger qu'au printemps suivant (Vereecken *et al.*, 2006).

*Andrena vaga* est souvent observée en syntopie avec *Colletes cunicularius* (Vereecken *et al.*, 2006). Cependant, l'andrène des sables cesse toute activité de visite florale lors de la fin de floraison de sa plante hôte au contraire de *Colletes cunicularius* qui continue à collecter sur d'autres espèces de plantes telles que *Rubus* sp., *Sorbus* sp., *Quercus* sp., *Ilex* sp. ou encore *Pyrus* sp. (Bischoff *et al.*, 2003 ; Müller & Kuhlmann, 2008 ; Vanderplanck *et al.*, 2009).

Jusqu'à présent, toutes les études basées sur l'analyse des charges scopales d'*Andrena vaga* (Bischoff *et al.*, 2003 ; Vanderplanck *et al.*, 2009) démontrent que celles-ci sont exclusivement composées de pollen de *Salix* sp. *Andrena vaga* est donc définie comme étant oligolectique stricte sur le genre *Salix*.



**Figure 12 :** A gauche, *Andrena vaga* et à droite, *Colletes cunicularius*, sur une inflorescence de *Salix* sp.  
(Photo N. Vereecken)

Les tissus d'*Andrena vaga* contiennent principalement du 24-méthylènecholstérol, du  $\beta$ -sitostérol et du  $\Delta^5$ -avénastérol. Carreaux (2011) a démontré que les tissus des femelles d'andrènes non-émergées ne contenaient pas d'érythrodiol alors que les tissus des femelles émergées en contenaient un faible pourcentage (5,9%). Il a aussi été observé que la concentration en érythrodiol dans les tissus de la femelle variait en fonction de la date de collecte. Au début de leur période de vol et donc de leur alimentation, la concentration en érythrodiol est élevée. Elle diminue ensuite lorsque les premiers follicules ovariens apparaissent et lorsque des œufs sont observés sur le site de nidification. A la fin de leur vie, la concentration en érythrodiol diminue de nouveau, les femelles ont pondus tous leurs œufs et cessent toute activité.

Les profils stéroliques des andrènes femelles diffèrent de ceux des mâles. La concentration en stérols totaux des mâles représente le triple de celle des femelles (Vanderplanck, 2009). La proportion du 24-méthylènecholestérol est beaucoup plus grande chez les mâles et le  $\Delta^5$ -avénastérol est le deuxième stérol par ordre d'importance chez les andrènes femelles (28,04 % des stérols totaux contre 14,23 % des stérols totaux chez les mâles). La proportion en cholesténone est également importante au sein du profil larvaire et est par ailleurs récurrente dans les profils stéroliques tout au long du cycle de l'insecte, quelque soit le stade ou le sexe de l'individu. Ce composé pourrait avoir un rôle dans le métabolisme de l'espèce (Vanderplanck, 2009).

*Andrena vaga*, tout comme *Apis mellifera*, semble avoir perdu la capacité de désalkyler les phytostérols en cholestérol. Cependant, contrairement à *Apis mellifera*, l'andrène vague ne synthétise pas de makistéron A comme hormone de mue (Carreaux, 2011).

L'existence de jours distincts entre la collecte du pollen et du nectar a été confirmée chez *Andrena vaga*. Les abeilles réalisent typiquement un voyage d'approvisionnement en nectar, mais elles réalisent jusqu'à 4 voyages d'approvisionnement les jours de récolte de pollen. Les retours avec pollen et avec nectar sont similaires au niveau du comportement (Rezkova *et al.*, 2011).

Jusqu'à présent, très peu d'indications sur les signaux utilisés par les abeilles oligolectiques pour trouver leurs plantes hôtes étaient connues. Les composés du parfum floral sont généralement importants pour permettre aux abeilles de reconnaître leurs plantes hôtes. Dötterl *et al.* (2005) ont mené une étude sur l'attraction qu'a *Andrena vaga* pour le parfum floral de deux espèces de saule, *Salix caprea* et *Salix atrocinerea*. Ces deux espèces présentent des profils odorants relativement similaires. Les antennes des mâles et des femelles d'*Andrena vaga* reconnaissent jusqu'à 16 composés présents chez ces espèces. La plus forte réponse antennaire est provoquée par le 1,4-diméthoxybenzène. A la fin de leur période de vol, les abeilles ne sont plus du tout attirées par ce composé. Il semblerait que seules les femelles fraîchement émergées soient donc attirées (Dötterl *et al.*, 2005).

### 1.5.2. Le genre *Salix* L.

Le nombre d'espèces incluses dans le genre *Salix* est estimé à 300 – 550 espèces, largement distribuées dans les régions tempérées et froides de l'hémisphère nord, avec quelques espèces s'étendant jusqu'à l'Amérique du Sud et en Afrique. Les espèces de *Salix* sont diversifiées en Chine (275 spp), en ex-union soviétique (107 spp), en Amérique du Nord (103 spp) et en Europe (65 spp) (Chen *et al.*, 2010).

Une révision de la taxonomie du genre *Salix* faite par Chen *et al.* (2010), démontre la monophylie du groupe. Le groupe *Salix* se subdivise en deux larges clades, un incluant toutes les espèces du sous-genre *Salix* exceptées les sections *Triandrae* et *Urbanianae*, et l'autre comprenant toutes les espèces des sous-genres *Chamaetia* et *Vetrix* plus *Chosenia*, sections *Triandrae* et *Urbanianae*. Les espèces du Nouveau Monde et de l'Ancien Monde du sous-genre *Salix* forment chacun un clade bien supporté. Le sous-genre *Salix* n'est pas monophylétique (Chen *et al.*, 2010).

Le genre *Salix* est connu comme un genre taxonomique difficile. Beaucoup d'espèces du genre présentent des polymorphismes génotypiques intraspécifiques ainsi que des variations morphologiques considérables. Il existe aussi des différences complexes entre certaines espèces. Tous les *Salix* sont dioïques et ont des moments différents de développement pour les fleurs et les feuilles, les fleurs apparaissant en premières. Il est donc difficile de faire des observations sur tous les caractères pertinents sur une seule plante. De plus, il y a une fréquence relativement élevée d'hybrides interspécifiques naturels chez *Salix* (Chen *et al.*, 2010).

Les saules se retrouvent dans les zones fraîches et humides. Leur période de floraison débute en mars en Europe de l'Ouest. *Salix* est un genre ligneux, préférant des sols à pH allant de 5.5 à 7.5. *Salix caprea* est le seul saule qui ne pousse pas seulement à proximité de l'eau, mais aussi dans les forêts. Cet arbre est une espèce pionnière typique, qui colonise rapidement clairières et coupes forestières (Dreyer & Dreyer, 1998).

Le genre *Salix* est visité par de nombreuses espèces d'abeilles solitaires probablement à cause de son pollen facilement accessible (Michener, 2007). Il représente une des premières sources de nourriture accessible au début du printemps. Parmi les espèces de *Salix*, le saule marsault (*Salix caprea* L.) est réputé

comme plante mellifère car ses potentiels nectarifères et pollinifères sont élevés (> 100 kg/ha).

Une étude précédente (Vanderplanck, 2009) a permis de déterminer la composition chimique du pollen de *Salix caprea*. Celle-ci se caractérise par une composition chimique riche en érythrodiol (38,86 %), en  $\beta$ -sitostérol (24,89 %) ainsi qu'en  $\Delta$ 5-avénastérol (21,56 %) mais faible en 24-méthylènecholestérol (3,12 %).

Les tissus de saule contiennent typiquement une série diversifiée de composés phénoliques comme des salicylates, des dérivés d'acide cinnamique, des flavonoïdes, et des tannins condensés, dont bon nombre ont été montré pour affecter la sélection de l'hôte et la performance des insectes phytophages (Nyman *et al.*, 2005).

## 1.6. Conservation

Des inquiétudes au sujet d'une potentielle « crise des pollinisateurs » mondiale ont été soulevées depuis plus d'une décennie. Antérieurement à 2006, la documentation sur le déclin des abeilles était limitée à quelques cas d'études et considérait seulement des endroits spécifiques (e.g. bourdons, Williams P.H., 1986 ; abeilles, Williams I.H. *et al.*, 1991 ; abeilles solitaires, Westrich, 1989), et n'était pas souvent publiée dans la littérature scientifique. La nécessité d'une compréhension plus complète de la situation mondiale des pollinisateurs a déclenché un certain nombre de projets et d'études visant à fournir des évaluations à grande échelle et taxonomiquement diverses. Il est donc essentiel de comprendre l'écologie de base des abeilles afin de prédire comment ils réagissent aux changements environnementaux et comment ces changements peuvent être atténués (Murray *et al.*, 2009).

Les plantes et les pollinisateurs peuvent avoir des liens très étroits et des exemples montrent que la perte de pollinisateurs peut conduire au déclin de leurs plantes associées. La conservation des plantes et des pollinisateurs est donc fortement associée (Mayer *et al.*, 2011).

Des facteurs anthropologiques et stochastiques peuvent causer la disparition d'espèces. En général, la taille des populations d'une espèce est d'abord réduite par des facteurs déterministes tels que la perte d'habitat, la fragmentation, la

surexploitation, les espèces introduites, la pollution et le changement climatique. Les populations peuvent alors atteindre un point de «non-retour», où des événements stochastiques démographiques, environnementaux, génétiques ainsi que des catastrophes les conduisent éventuellement à l'extinction. Par conséquent, la taille absolue de la population et également la variabilité spatio-temporelle dans la taille de la population sont les prédicateurs les plus importants pour déterminer le risque d'extinction, leur estimation précise est d'une importance primordiale pour la biologie de conservation (Murray *et al.*, 2009).

La taille de la population effective, et donc la vulnérabilité, d'une espèce ne dépend pas seulement du nombre de nids, mais aussi du mode de fondation de la colonie, du nombre d'individus reproducteurs et du biais de reproduction parmi les individus (Murray *et al.*, 2009).

Pour conserver les populations d'espèces d'abeilles en voie de disparition, la connaissance de leurs exigences quantitatives en pollen et en fleurs est cruciale. Les grandes quantités de pollen nécessaires pour la reproduction sont probablement une importante raison du déclin de nombreuses espèces durant les dernières décennies. La destruction des habitats et les pratiques agricoles modernes mènent à une diminution notable dans la diversité des espèces de plantes et dans la quantité de fleurs dans beaucoup de régions du monde. La pénurie alimentaire pourrait être une cause principale de ce déclin. (Müller *et al.*, 2006).

En raison de leur besoin en pollen plus élevé, les grandes espèces d'abeilles seraient plus enclines à une extinction locale que des espèces plus petites. En effet, la prédisposition d'extinction et pourrait être corrélée avec la masse corporelle moyenne des abeilles. En effet, les abeilles de grande taille ont tendance à être plus sujettes à l'extinction (Larsen *et al.*, 2005 dans Müller, 2006).

Les espèces d'abeilles sociales sont généralement polylectiques (Michener, 2007) et sont généralement considérées comme moins sujettes à l'extinction locale. Cependant, Kleijn & Raemakers (2008) ont récemment montré que les espèces de bourdons dont les populations sont en déclin utilisent un spectre plus étroit de plantes hôtes que les bourdons aux populations stables (Murray *et al.*, 2009).

## 1.7. Objectifs

Ce travail comporte trois objectifs :

- (i) Confirmer l'oligolectisme d'*Andrena vaga* en élargissant les analyses palynologiques sur toute sa distribution.
- (ii) Etudier la composition stérolique, protéique ainsi que la composition en acides aminés totaux, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, du pollen floral de *Salix* sp., des tissus de femelles d'*Andrena vaga* et de leur pollen scopal.

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

- Y a-t-il une différence de composition chimique au sein de différentes espèces du genre *Salix* (niveau interspécifique) ?
  - Existe-t-il une variation de la composition chimique au sein d'une même espèce de *Salix* en fonction de la localisation (niveau intraspécifique) ?
  - Les femelles d'andrènes, le pollen scopal, ainsi que le pollen floral, présentent-ils un profil chimique similaire selon la situation géographique ?
- (iii) Selon la qualité nutritionnelle des différentes espèces de saule étudiées, définir le degré de spécialisation entre *Andrena vaga* et le genre *Salix*, et mettre celui-ci en parallèle avec la conservation de l'espèce.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Echantillonnage et conservation du matériel biologique

#### 2.1.1. Sélection des sites de collecte

Les stations de collecte ont été sélectionnées selon leurs distances géographiques respectives ainsi que par la présence de saule et/ou d'*Andrena vaga*. Au total, neuf stations ont été établies : Blaton (S01), Tertre (S04), Flines (S02) et Mons (S08) constituent les stations les plus proches tandis que les stations de Saint-Nazaire (S07), Malassis (S04), Aristi (S05), Koolkerke (S09) et Plateau des Tailles (S06) sont plus distantes géographiquement (*Fig. 15 ; Annexe 1*).

Le pollen de *Salix* a été récolté sur sept stations et les abeilles sur cinq stations.

**Table 2 :** Espèces de *Salix* récoltées par station. Les codes relatifs aux stations renvoient à l'annexe 1.

| Station                   | Espèce                   |
|---------------------------|--------------------------|
| Saint-Nazaire (S07)       | <i>Salix atrocinerea</i> |
| Koolkerke (S09)           | <i>Salix atrocinerea</i> |
| Malassis (S03)            | <i>Salix caprea</i>      |
| Flines (S02)              | <i>Salix caprea</i>      |
| Blaton (S01)              | <i>Salix caprea</i>      |
| Mons (S08)                | <i>Salix x rubens</i>    |
| Plateau des Tailles (S06) | <i>Salix viminalis</i>   |
| Tertre (S04)              | <i>Salix alba</i>        |



**Figure 15 :** Vue d'ensemble des stations de récolte. S01 : Station Blaton, S02 : Station Flines, S03 : Station Malassis, S04 : Station Tertre, S05 : Station Aristi, S06 : Station Plateau des Tailles, S07 : Station Saint-Nazaire, S08 : Station Mons, S09 : Station Koolkerke. Les codes relatifs aux stations renvoient à l'annexe 1. (source : Google Earth)

Selon la disponibilité du matériel, divers échantillons ont été récoltés sur chacun des sites : des femelles, du pollen floral et du pollen scopal. Malheureusement, il n'a pas été possible de collecter du pollen floral sur chacun des sites. De même, certains sites ont été sélectionnés volontairement pour l'absence de l'espèce *Andrena vaga*, que ce soit pour un problème apparent d'écologie (absence de zone sableuse nécessaire pour la nidification) –Plateau des Tailles- ou pour une raison inconnue qui pourrait être l'absence d'une ressource alimentaire adaptée – Saint-Nazaire. Pour ces sites, ni charges scopales ni femelles n'ont pu être échantillonnées. L'ensemble des collectes est détaillé dans la Table 3.

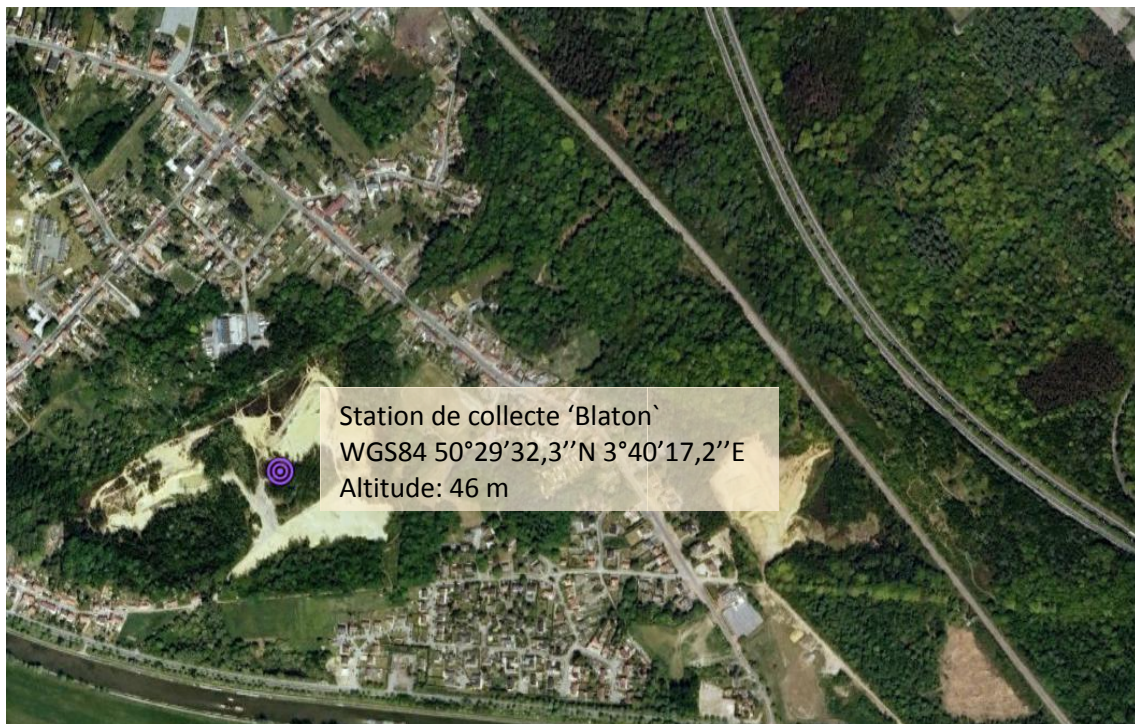
**Table 3** : Matériel biologique échantillonné. Les codes relatifs aux stations renvoient à l'annexe 1.

| <i>Site de récolte</i>    | <i>Pollen floral</i> | <i>Pollen scopal</i> | <i>Femelles andrènes</i> |
|---------------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Blaton (S01)              | ✓                    | ✓                    | ✓                        |
| Tertre (S04)              | ✓                    | ✓                    | ✓                        |
| Flines (S02)              | ✓                    | ✓                    | ✓                        |
| Malassis (S03)            | ✓                    | ✓                    | ✓                        |
| Aristi (S05)              | -                    | ✓                    | ✓                        |
| Plateau des Tailles (S06) | ✓                    | -                    | -                        |
| Saint-Nazaire (S07)       | ✓                    | -                    | -                        |
| Mons (S08)                | ✓                    | -                    | -                        |
| Koolkerke (S09)           | ✓                    | -                    | -                        |

## 2.1.2. Description des sites de collecte

### 2.1.2.1. La Grande Bruyère de Blaton (S01)

Ce vaste site, altéré par le déversement de déchets et la fréquentation par les engins tout-terrain, bénéficie depuis peu du statut de réserve naturelle domaniale. Il comprend notamment des étendues de sables non ou peu fixées, colonisées par une végétation caractéristique (*Aira praecox*, *A. caryophylla*, *Agrostis vinealis*, *Jasione montana*,...), des lambeaux de lande à callune, des zones densément envahies de saules, quelques petits massifs boisés, une zone humide, une falaise relictuelle et des friches. Son intérêt entomologique est exceptionnel, notamment par la présence d'une très grande diversité hyménoptérologique (Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website ; Fig. 16).



**Figure 16** : Localisation de la station 'Blaton, S01' (source : Google Earth)

### 2.1.2.2. La forêt domaniale de Flines-les-Mortagne (S02)

La Forêt domaniale de Flines-les-Mortagne, protégée par Natura 2000, est l'un des massifs boisés de la région Nord-Pas-de-Calais. Les 240 ha de forêt s'étendent sur la partie nord-est du territoire de la commune de Flines-les-Mortagne, le long de la frontière belge, dans l'arrondissement de Valenciennes entre la Scarpe canalisée et la rive droite de l'Escaut canalisé.

C'est une forêt de plaine qui constitue l'un des grands éléments naturels du vaste ensemble écologique de la plaine alluviale de l'Escaut. Elle est caractérisée par un très léger relief (altitude variant de 23 à 40m par rapport au niveau moyen de la mer) qui explique les nuances paysagères et floristiques de cette zone. L'assise du massif forestier est constituée d'un sable acide et localement ferrugineux avec une couche argileuse affleurante.

Ce massif est de type « *hêtraie chênaie sessiliflore acidiphile subatlantique* » avec différentes variantes de dégradation vers la chênaie à bouleaux ou vers la boulaie, ce qui correspond à des sols appauvris par une exploitation de longue date (Fig. 17).



**Figure 17 :** Localisation de la station 'Flines, S02' (source : Google Earth)

### 2.1.2.3. La forêt de Malassis (S03)

La commune de Forges-les-bains présente des dénivellations importantes pour la région parisienne (de 92 à 169 m), correspondant aux dépressions des ruisseaux. Les sols sont essentiellement argileux et argilo-limoneux sur les plateaux et les dépressions, avec des affleurements sableux en particulier à l'ouest et au sud de la commune (Fig. 18).

Sur ce site, *Andrena vaga* et *Colletes cunicularius* sont trouvées en syntopie. Par contre, il est à préciser que les plants de *Salix caprea* ne se trouvent pas à proximité du site de nidification.



**Figure 18 :** Localisation de la station 'Malassis, S03' (source : Google Earth)

#### 2.1.2.4. Le lac des Herbières à Tertre (S04)

La commune de Tertre est réputée pour ses industries réfractaires. On y trouvait un charbonnage, une centrale thermique et une Cokerie (Fig. 19).

Sur ce site, des sites sablonneux propices à la nidification de l'andrène vague sont également présents. La végétation est composée en partie de plusieurs espèces de saules.



**Figure 19 :** Localisation de la station 'Tertre, S04' (source : Google Earth)

#### 2.1.2.5. Le village d'Aristi en Grèce (S05)

Aristi est un village du Zagori (Zagorochoria) en Épire, au nord de la Grèce. Il est situé à l'entrée du parc national de Vikos – Aoos qui renferme le plus profond canyon d'Europe : les gorges de Vikos (Fig. 20).

Ce site a été sélectionné car il se trouve à l'extrême sud de la distribution d'*Andrena vaga*. A nouveau, les conditions écologiques requises pour la présence de cette espèce d'abeille sont rassemblées (présence de sable, de saule, ...). L'espèce majoritairement présente dans cette région est *Salix alba*.

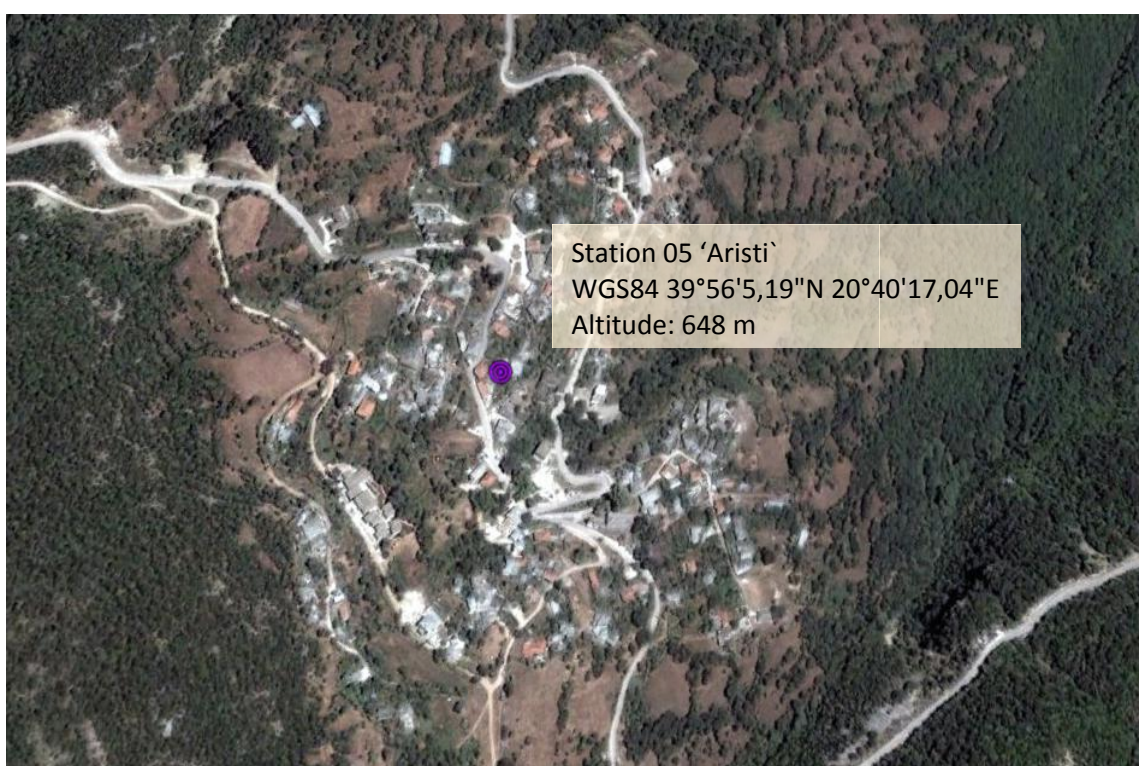


Figure 20 : Localisation de la station 'Aristi, S05' (source : Google Earth)

#### 2.1.2.6. Le Plateau des Tailles (S06)

Le Plateau des Tailles est situé au sud-est de la Wallonie, en plein cœur de l'Ardenne, sur le territoire des communes de Manhay, La Roche, Houffalize, Vielsalm, Lierneux (province du Luxembourg). La Baraque Fraiture, située à une altitude de 640 m, constitue le point de repère central. Une multitude de ruisseaux naissent du plateau, appartenant aux bassins hydrographiques de l'Ourthe et de l'Amblève.

Le Plateau des Tailles est compris dans un chapelet de zones élevées qui constitue l'ossature du massif ardennais : Hautes Fagnes, Fagnes spadoises, Plateau de Saint-Hubert, Massif de la Croix-Scaille. Ces régions, caractérisées par un climat particulier, accueillent des milieux similaires, dont les très emblématiques tourbières hautes. Le Plateau des Tailles supporte un climat rude avec des hivers froids et une pluviosité importante.

Les roches rencontrées sont variées : grès, poudingues, quartzites, schistes, phyllades. Elles génèrent des sols très pauvres, souvent imperméables (argile blanche) et parfois couverts d'une couche importante de tourbe. Le Plateau des Tailles est en grande partie couvert de forêts, dans lesquelles l'épicéa domine largement, suivi par le hêtre. Ces zones boisées sont entrecoupées par des milieux ouverts, pour la plupart largement modifiés par l'homme : prairies pâturées, prairies de fauche, landes sèches et humides. Les tourbières n'occupent que des surfaces très marginales (Jacquemart *et al.*, 2008 ; Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website ; Fig. 21).

Ce biotope, en contraste avec les exigences écologiques de l'andrène vague, compte malgré tout parmi sa végétation quelques spécimens du genre *Salix*. Dans ce cas-ci, un échantillon de *Salix viminalis* a été récolté.

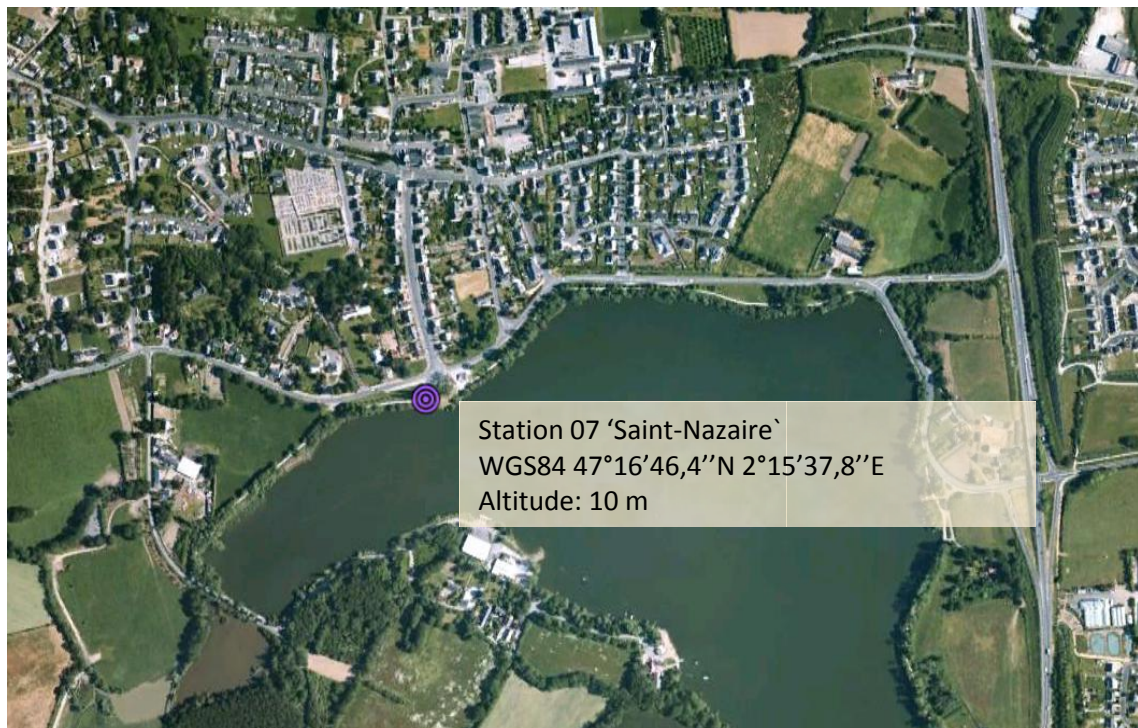


**Figure 21** : Localisation de la station 'Plateau des Tailles, S06' (source : Google Earth)

#### 2.1.2.7. L'étang du Bois-Joalland à Saint-Nazaire (S07)

L'étang du Bois-Joalland, situé dans le quartier de l'Immaculée, a été creusé par l'armée américaine lors de la première guerre mondiale. Cet étang de 65 hectares avait pour but d'alimenter la ville en eau potable (Fig. 22).

Bien que la station soit sablonneuse et que des individus de *Colletes cunicularius*, espèce syntopique d'*Andrena vaga*, soit observés sur le site, l'absence d'*Andrena vaga* se fait remarquer. Dans cette région, la principale espèce de saule rencontrée est *Salix atrocinerea*.



**Figure 22 :** Localisation de la station 'Saint-Nazaire, S07' (source Google Earth)

#### 2.1.2.8. Le Grand Large de Mons (S08)

Le relief de la commune de Mons est influencé par la vallée de la Haine. Le sous-sol de la vallée de la Haine est composé d'alluvions. Le climat de la région de Mons est un climat tempéré océanique comme pour l'ensemble de la partie occidentale de la Belgique (Fig. 23).

Aux abords du Grand Large, du pollen floral de *Salix x rubens* a été échantillonné. Ce spécimen est un hybride entre *Salix fragilis* et *Salix alba*.



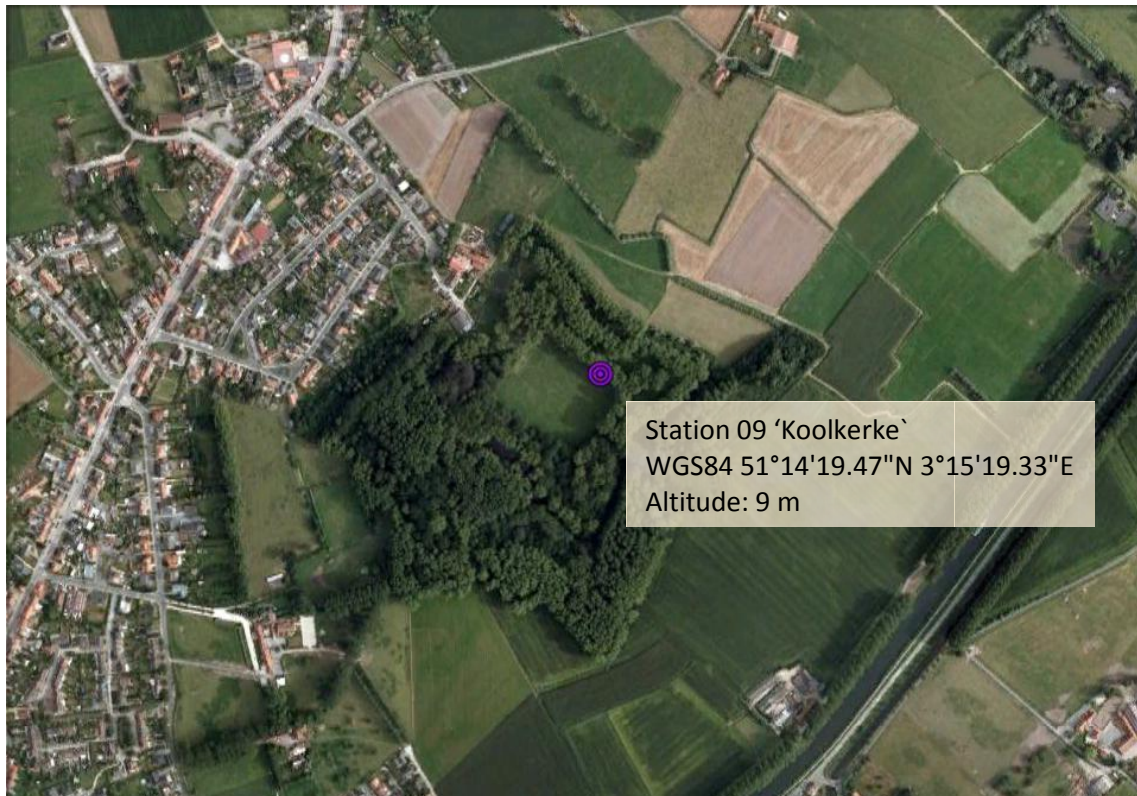
**Figure 23 :** Localisation de la station 'Mons, S08' (source Google Earth)

### 2.1.2.9. La forteresse Beieren à Koolkerke (S09)

Koolkerke est une section de la ville belge de Bruges située en Région flamande dans la province de Flandre-Occidentale.

Situé à proximité de la côte belge, l'échantillon de *Salix atrocinerea* récolté sur cette station permet d'obtenir une comparaison avec l'échantillon récolté sur la côte d'Amour (Saint-Nazaire).

La présence de *Salix atrocinerea* dans cette région est très anecdotique. Les espèces principalement retrouvées sont *Salix caprea* et *Salix alba*. *Andrena vaga* est également bien présente dans la région.



**Figure 24 :** Localisation de la station 'Koolkerke, S09' (source Google Earth)

### **2.1.3. Pollen**

#### **2.1.3.1. Pollen floral collecté manuellement**

Le pollen floral a été récolté directement sur la plante à l'aide d'un diapason qui permet de faire vibrer les étamines pour en détacher les grains de pollen. Le pollen est préalablement nettoyé manuellement sous binoculaire. Après avoir été pesé, le pollen est lyophilisé avant d'effectuer une nouvelle prise de poids afin de déterminer la matière sèche et de minimiser les variations hygroscopiques de poids entre les différents pollens. Les échantillons sont conservés à -40°C dans un tube Eppendorf. Un total de 200mg de pollen frais est requis par échantillon en vue des différentes analyses.

#### **2.1.3.2. Pollen collecté par les femelles d'abeilles**

Pour déterminer le profil stérolique des différentes espèces florales dont le pollen est consommé par l'andrène vague, il est indispensable de capturer des femelles portant des charges scopales. Les différents individus sont placés à -40°C pour les rendre inactifs et facilement manipulables.

Une à une, les andrènes sont maintenues à l'aide d'une pince au dessus d'un tube Eppendorff. Elles sont alors débarrassées de leurs charges scopales à l'aide d'un petit crochet et d'un pinceau. Les charges scopales des échantillons d'une même station sont rassemblées au sein d'un même Eppendorf. A nouveau, les échantillons sont pesés avant et après lyophilisation. Ils sont ensuite conservés à -40°C jusqu'à analyse.

### **2.1.4. Adultes**

Les femelles d'andrènes ont été capturées à l'aide d'un filet ou directement à même le sol lors des approvisionnements de leurs cellules larvaires. Tous les individus capturés sont placés individuellement dans des tubes Eppendorf numérotés de manière à faire référence à la station et à l'identifiant de l'individu collecté. Elles sont ensuite pesées et conservées à -40°C. Les adultes sont analysés en poids frais et ne doivent donc pas être lyophilisés. Le détail des échantillons récoltés au cours de cette étude ainsi que leurs origines sont repris dans en annexes 1 et 2.

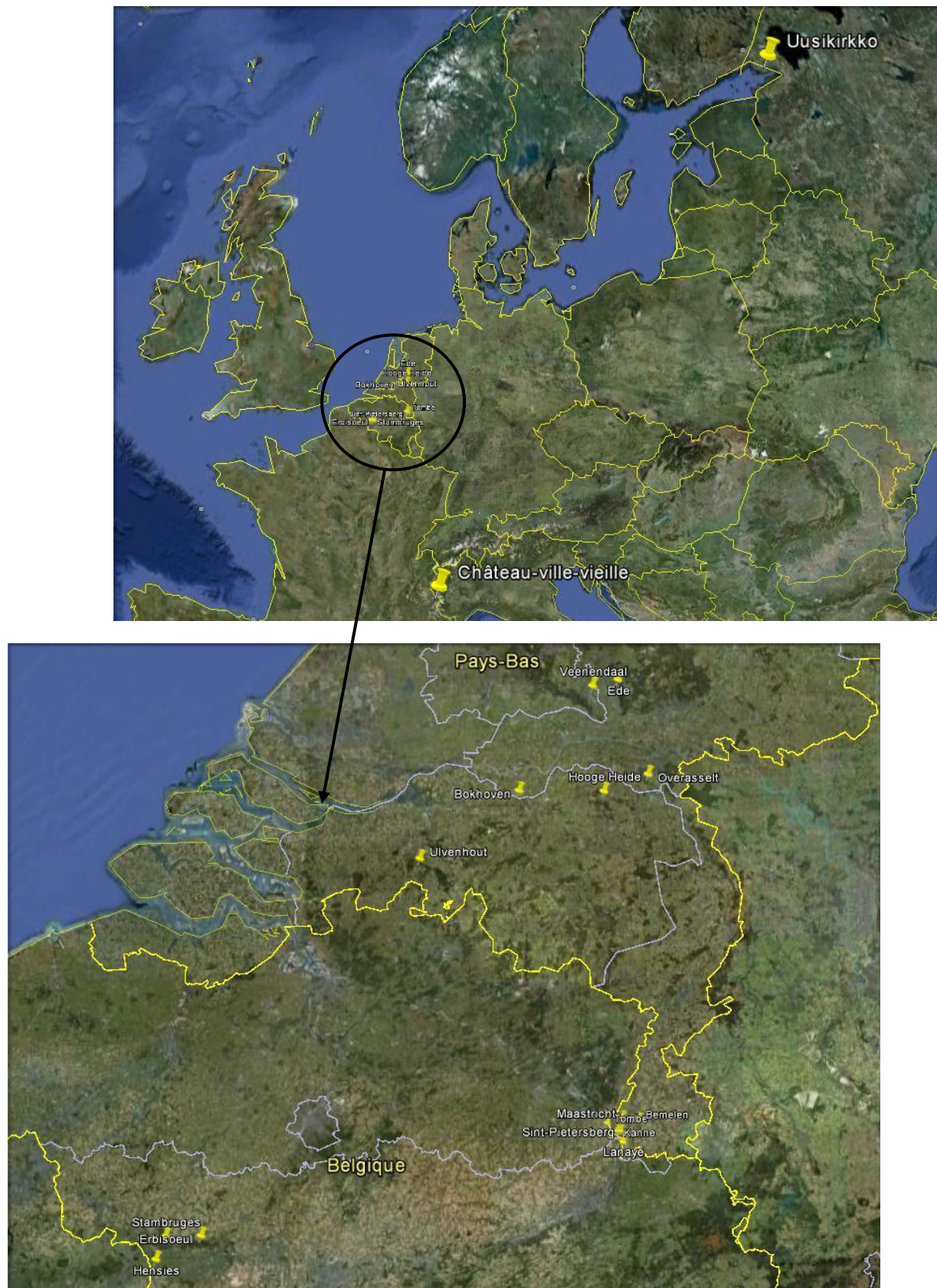
## 2.2. Analyses palynologiques

Afin de vérifier l'oligolectisme d'*Andrena vaga* sur toute sa distribution, des lames microscopiques de pollen scopal ont été réalisées. Les pattes postérieures de chaque abeille capturée ont été précautionneusement tamponnées avec un petit cube de gélatine. Le fragment de gélatine est ensuite disposé sur une lame et passé au dessus d'une source de chaleur. Une fois la gélatine fondue, elle est recouverte d'une fine lamelle et laissée à refroidir afin de figer de manière durable le pollen.

La structure des différents grains est alors investiguée sous microscope optique afin d'identifier et dénombrer les différentes espèces florales présentes sur base de l'ouvrage de Moore *et al.* (1978). Un balayage systématique des lames est réalisé afin de dénombrer et d'identifier les différents pollens présents, cela afin d'établir le pourcentage de pollen des différentes espèces présentes.

D'autres échantillons issus de collections sont également étudiés sous microscope afin d'obtenir le maximum de données sur la composition des charges scopales des femelles sur l'ensemble de la distribution d'*Andrena vaga*. Les individus nous ont été procurés par le biais de différentes institutions comme le National Museum of Natural History of Leiden et la collection du laboratoire de Zoologie de l'UMons (Liste des spécimens, *Annexe 3, Table 11*).

A. PINCZEWSKI – Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer)  
(Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae) – 2012



**Figure 24 :** Vue d'ensemble des endroits de récolte des différents spécimens de collections analysés. La liste des stations est reprise en Annexe 3. (Source : Google Earth)

## 2.3. Analyses stéroliques micro-quantitatives

Concernant les analyses stéroliques de type palynologique, trois répétitions ont été réalisées tant sur le pollen floral que sur le pollen scopal. Pour l'analyse des andrènes, 5 femelles par station de collecte ont été analysées (sélection aléatoire parmi les individus collectés). Au total, 58 échantillons ont été analysés : 25 femelles, 6 pollens floraux analysés en triplicat et 5 pollens scopaux analysés en triplicat hormis pour la station 'Aristi' S05 (*Annexe 1*) pour laquelle la quantité de pollen disponible n'a permis d'effectuer qu'une seule analyse.

Le protocole utilisé a été mis au point par Vanderplanck *et al.* (2011) et est basé sur la méthode de Lognay *et al.* (1989, 1992). Les analyses se sont déroulées à l'UMONS, au sein du laboratoire de Zoologie du Professeur Rasmont.

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

### 2.3.1. Préparation des échantillons

#### *Pollen scopal et floral*

Les différents lots de pollen préalablement lyophilisés sont décongelés. Pour chacun d'entre eux, trois aliquots de 20 mg ont été pesés (quantité optimale déterminée lors d'une étude précédente – Vanderplanck *et al.* 2011).

#### *Adultes*

Avant saponification, les adultes décongelés sont débarrassés de leurs pattes et de leurs ailes. Ils sont ensuite pesés avec précision et broyés dans la solution de saponification (voir section 2.3.2.). Chaque individu est analysé dans son intégralité.

### 2.3.2. Analyse des échantillons

L'échantillon est préalablement homogénéisé avec de l'hydroxyde de potassium méthanolique.

L'analyse commence par une saponification. Cette opération vise à séparer la partie insaponifiable, contenant les stérols, de la partie saponifiable. Pour ce faire, les différents échantillons sont homogénéisés dans une solution d'hydroxyde de

potassium méthanolique 2 M (2,5 ml). La réaction de saponification est effectuée durant une heure dans un bain marie à 80°C. Après cette réaction, la solution échantillon est laissée à refroidir et 1 ml de standard interne de bétuline (0,05 mg/ml) est ajouté. Cette concentration connue permettra d'estimer la concentration des autres composés présents dans le mélange. Les échantillons sont ensuite dilués à l'aide de 2,5 ml d'eau milli-Q.

La fraction insaponifiable est extraite par épuisement à l'aide de trois rinçages effectués avec 5 ml éther diéthylique chacun. La fraction insaponifiable est ensuite nettoyée par trois rinçages à l'aide de 5 ml d'eau milli-Q afin d'éliminer la majorité des savons résiduels. L'extrait étheré est ensuite filtré sur sulfate de sodium anhydre afin d'éliminer toute trace d'eau et évaporé à sec sous vide avant d'être repris par 250 µl de chloroforme.

Afin de purifier les stérols, l'échantillon est déposé sur une plaque de verre recouverte d'une fine couche de silice faisant office d'absorbant. L'échantillon est déposé de façon linéaire sur la largeur de la plaque à l'aide d'un capillaire fixé sur un support de chromatographie préparative. Les plaques sont ensuite disposées de manière verticale dans des cuves à chromatographie (élution ascendante). L'éluant est composé d'un mélange de chloroforme, d'éther diéthylique et d'ammoniac (90 : 10 : 0,5). Au cours de cette chromatographie sur couche mince, les stérols sont séparés des autres constituants de la fraction. Deux spots de référence (mélange cholestérol/bétuline à forte concentration) ayant été déposés de part et d'autre de l'échantillon avant élution, permettent la visualisation et la localisation des produits d'intérêt simplement par analogie avec les références chromatographiées en même temps que l'échantillon.

Les stérols étant incolores, ils ne peuvent être détectés à l'œil nu. Leur visualisation n'est possible qu'après une réaction chimique effectuée sur la plaque après élution (méthode de détection post-chromatographique). Le réactif utilisé est une solution de 2',7'-dichlorofluorescéine éthanolique 0,2% vaporisée de manière homogène sur l'ensemble de la plaque. Les stérols peuvent alors être localisés grâce à une révélation sous ultra-violet (254 nm).

Une fois les bandes d'intérêt localisées sur la plaque (stérols et le standard interne de bétuline), elles sont soigneusement isolées par grattage de la zone sur la plaque de silice. La poudre de silice est alors extraite par épuisement à l'aide

respectivement de 5 ml, 3 ml et 3 ml de chloroforme. L'extrait chloroformé contenant les stérols et le standard interne purifiés est alors filtré (élimination des particules de silice en suspension) et évaporé à sec sous azote.

Les échantillons sont ensuite dérivatisés lors d'une silylation réalisée en présence de pyridine anhydre et d'un réactif de silylation (SILYL-991) dans un bain marie à 90°C durant 30 min. La silylation utilisée dans le cadre de cette analyse consiste en la substitution des atomes d'hydrogène actifs par un groupement triméthylsilyl (TMS). Cette étape permet d'assurer une stabilisation des molécules lors de l'analyse en phase gazeuse (GC-FID).

Les différents composés sont identifiés sur base des temps de rétention relatifs au CPG (identifications réalisées préalablement en GC-MS).

Les chromatogrammes sont ensuite traités à l'aide du programme ChromCard. La surface de chacun des pics est calculée suite aux intégrations des chromatogrammes et la concentration en chacun des stérols détectés peut être déterminée à partir du standard interne (facteur de réponse de 1 pour l'ensemble des composés stéroliques). Tous les pics compris entre le cholestérol et la bétuline sont pris en considération.

## 2.4. Analyses protéiques

### 2.4.1. Préparation des échantillons

Les analyses sont effectuées en triplicat sur chacun des lots de pollen. Pour chaque analyse protéique, une quantité de 5 mg de pollen est requise. Seul le pollen fait l'objet de ces analyses.

### 2.4.2. Analyse des échantillons

Le protocole utilisé a été mis au point par Vanderplanck (2012), adapté à partir du protocole pour les tissus végétaux récalcitrants de Wang *et al.* (2006). Les analyses ont été effectuées à l'UMONS, au sein du service de Protéomie du Professeur Wattiez. Au total, 9 échantillons ont été investigués (8 pollens floraux et 1 pollen scopal).

Afin de faciliter l'élimination des contaminants, le pollen est préalablement broyé à l'aide de billes de verre sous azote (5 broyages successifs).

Une série de trois bains est alors effectué pour éliminer les contaminants et les pigments du pollen : (i) bain d'acide trichloroacétique 10% dans l'acétone, (ii) bain d'acétate d'ammonium méthanolique (0,1 M dans du méthanol 80%) et (iii) bain d'acétone 80%. Entre chaque bain, l'échantillon est centrifugé, le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé dans le bain suivant sous agitation et sonication à 4°C. Lors du dernier bain, l'échantillon est placé à 50°C durant environ 10 min jusqu'à ce que toute trace d'acétone se soit évaporée.

Le culot de pollen ainsi nettoyé et séché est alors resolubilisé dans 500 µl de tampon d'extraction (30% sucrose, 2% SDS, 0,1M tris-HCl, 5% 2-mercaptoéthanol, pH 8,0). L'échantillon est alors placé sous agitation à 4°C durant 10 min. 500 µl de phénol sont alors ajouté et l'échantillon est placé à agitation durant 10 min à température ambiante. Les protéines extraites et mises en solutions dans le tampon d'extraction passent alors dans la phase phénolique supérieure. 400 µl de cette phase sont alors précautionneusement récupérés et placés dans un nouveau tube auquel sont ajoutés 1600 µl d'une solution d'acétate d'ammonium méthanolique 0,1 M glacée.

Le tube est alors vortexé et placé à -20°C durant toute une nuit afin d'assurer une purification des protéines par précipitation.

Suite à cette incubation, l'échantillon est centrifugé et le surnageant est délicatement éliminé en veillant à ne pas prélever le culot protéique. Les dernières traces de phénol ainsi que d'autres contaminants résiduels sont éliminées à l'aide de deux bains successifs : un premier bain au méthanol glacé (100%) et un second bain à l'acétone glacé (80%). Entre chaque bain, l'échantillon est centrifugé et le surnageant est éliminé.

L'échantillon est brièvement laissé sécher à l'air libre puis repris dans un tampon chlorhydrate de guanidine 4M pour resolubiliser les protéines purifiées.

### 2.4.3. Quantification

Le test colorimétrique utilisé pour la quantification est le BCA Protein Assay. Le réactif BCA utilisé pour réagir avec les liens peptidiques des protéines se compose d'un réactif A (acide bicinchoninique) et d'un réactif B (sulfate de cuivre) (B :A, 1 :50). Le complexe formé est de couleur pourpre dont l'intensité est proportionnelle à la concentration protéique de l'échantillon.

La quantification des protéines est effectuée dans une plaque multi-puits. Quatre courbes de calibration quadratiques sont réalisées sur cette plaque à l'aide de dilution d'un standard BSA 1mg/ml dans du tampon chlorhydrate de guanidine 4 M. Après 30 minutes d'incubation sur un agitateur à 37°C, la plaque est insérée dans un lecteur de plaques multi-puits. Les densités optiques sont mesurées à 570 nm par le programme OPTIMA. Trois mesures sont réalisées ; une directement après l'incubation, une à 5 minutes et une à 10 minutes. Comme les pollens sont analysés en triplicat et que le programme effectue 3 mesures, 9 valeurs sont données pour un échantillon de pollen. La concentration moyenne en protéines d'un lot de pollen est déterminée sur base de ces 9 mesures.

## 2.5. Analyses des acides aminés totaux

### 2.5.1. Préparation des échantillons

L'analyse des acides aminés totaux est effectuée sur les mêmes lots de pollen que pour les analyses stériliques et dans les mêmes conditions (pollen lyophilisé et conservé à -40°C).

### 2.5.2. Analyse des échantillons

Les analyses ont été effectuées au sein de l'unité de chimie biologique industrielle de l'Université de Liège (Gembloux Agro Bio-Tech). Un total de huit échantillons de pollens floraux ont été analysés en triplicat (soit 24 analyses).

Pour l'analyse des acides aminés totaux, 1ml de solution d'hydrolyse acide (HCl 6N, 0,1% de phénol et 500 µM norleucine) a été ajouté à 2 mg de pollen. Le tube est mis 1 minute sous azote pour éviter la dégradation de la méthionine, puis chauffé à 110°C durant 24 heures. L'hydrolysate est totalement évaporé sous vide dans un bain à ébullition à 100°C.

Ensuite, l'échantillon sec est repris dans 1ml de solution tampon de citrate de sodium à pH 2.2. La solution échantillon est ensuite homogénéisée, filtrée (0.2 µm) et transvasée dans un flacon HPLC avant injection.

Chaque acide aminé a été identifié et quantifié par une analyse sur chromatographe échangeur d'ion (analyseur d'acides aminés Biochrom 20plus). La séparation des acides aminés est effectuée sur base d'un gradient pH du tampon citrate de sodium et des valeurs de pKa des acides aminés individuels. Une réaction ninhydrine post-colonne produit ensuite des dérivés colorés détectés par UV (570 nm hormis pour la proline détectée à 440 nm). Les quantifications sont effectuées par comparaison des aires des différents acides aminés avec le standard de norleucine. Pour chacun des acides aminés, les différents facteurs de réponse ont été établis sur base d'injections de solutions standard. Seule la détermination du tryptophane a été omise. En effet, cet acide aminé est détruit lors de l'hydrolyse acide et son analyse seule requiert une quantité de matériel pollinique trop importante. Une étude précédente a par ailleurs déterminé que bien que le tryptophane soit un acide aminé essentiel pour l'abeille, il est rarement un facteur limitant (Standifer *et al.*, 1980).

## 2.6. Analyses statistiques

### 2.6.1. Données brutes

Pour chaque type d'échantillon analysé, les compositions en stérols et en acides aminées sont résumées en tableaux reprenant les abondances relatives des différents composés. Les concentrations en stérols totaux et acides aminés totaux sont également mentionnées afin de permettre une comparaison en terme de quantification absolue.

Les différents tests statistiques utilisés lors de cette étude, ainsi que les différents graphes présentés ont été réalisés grâce au logiciel R (version 2.9.1).

### 2.6.2. Analyse de la variance

Afin de détecter une éventuelle différence significative de contenu protéique entre le pollen des différentes espèces de saule, les données ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA) suivi d'une comparaison multiple des moyennes (test post-hoc). S'agissant d'un test paramétrique, il est indispensable de vérifier que les conditions d'application suivantes soient bien remplies : (i) échantillonnage aléatoire, (ii) observations indépendantes, (iii) une variable quantitative, (iv) une variable qualitative à 3 niveaux ou plus, (v) homoscedasticité ou égalité des variances (test de Bartlett,  $H_0$  = égalité des variances) et (vi) normalité de la distribution des résidus (test de Shapiro,  $H_0$  = distribution normale).

Le seuil  $\alpha$  fixé pour les différents tests (Bartlett, Shapiro et ANOVA) est de 5%. L'interprétation de la *p-value* retournée par l'analyse de la variance permettra de savoir si il existe une différence significative entre le pollen des différentes espèces florales. Les différences seront ensuite ciblées avec plus de précision grâce au test post-hoc qui retournera une *p-value* pour l'ensemble des espèces comparées deux à deux. Afin de visualiser les données, un graphique des moyennes a été réalisé. Il reprend notamment les résultats des comparaisons multiples.

### 2.6.3. Analyses multivariées

Dans le domaine de la biologie en général, les différents échantillons sont souvent caractérisés par un grand nombre de variables. Les tableaux de données, de forme « cas x variables », sont alors de taille conséquente. Chaque variable représentant une dimension, la visualisation des données dans un espace à faible dimension devient impossible.

En raison du haut degré de similitude entre les matrices de données chimiques et les matrices de données de communautés écologiques, des méthodes d'analyses multivariées, typiquement utilisées pour les données de communautés écologiques, ont été appliquées.

#### 2.6.3.1. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS)

Pour évaluer visuellement les différences de composition parmi les échantillons, un positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS ; non Metric Multidimensional Scaling) a été effectué.

Le positionnement multidimensionnel non métrique est souvent utilisé dans le domaine de la visualisation d'information et permet, à la fois, de trouver une relation non-paramétrique entre les dissimilarités des données et de localiser chaque objet dans un espace à faible dimension.

Il s'agit d'une méthode d'ordination basée sur des matrices de distance entre objets (matrice de distance Bray-Curtis). Les objets sont placés dans un espace à N dimensions, où le nombre d'axes est prédéfini. Pour des 'N' suffisamment petits, les positions peuvent être représentés à l'aide d'un graphe en 2D ou en 3D. Pour générer chaque graphe nMDS, le nombre de dimensions le plus parcimonieux (le plus petit nombre d'axes) a été évalué pour représenter en juste proportion les données.

Le modèle nMDS vise à minimiser une fonction de *stress* (si  $< 0.2$ , l'interprétation des résultats est écologiquement utilisable). Celle-ci est générée en utilisant 10 itérations du nMDS pour des dimensions allant de  $n = 1$  à  $n = 5$ . Un seuil limite conventionnel  $< 0.2$  a été appliqué pour déterminer le nombre acceptable de dimensions. Utilisant le nombre approprié de dimensions, la procédure nMDS a été

répétée avec 50 itérations pour explorer plus entièrement l'espace d'ordination à cette dimensionnalité. La fonction de *stress* minimale a été utilisée pour produire les graphes nMDS dans lesquels chaque point représente un échantillon de pollen ou une femelle d'andréne. La distance spatiale entre les points sur le graphe peut être interprétée comme la différence relative des compositions chimiques : les points les plus proches sont plus similaires tandis que les points les plus distants présentent le plus de dissimilarités.

### 2.6.3.2. Analyse multivariée de la variance par test de permutation

Lorsque qu'un jeu de données est composé de plusieurs variables dépendantes, il est nécessaire d'avoir recours à des tests multivariés. En effet, l'utilisation de tests univariés indépendamment pour chaque variable augmente le risque de conclure à une différence significative qui n'est peut-être pas réelle.

Une analyse multivariée de la variance par test de permutation (PerMANOVA ; Permutational Multivariate Analysis of Variance) a été réalisée pour tester l'hypothèse nulle de non différence entre les compositions chimiques des différents échantillons investigués.

La PerMANOVA est une version de la MANOVA traditionnelle basée sur des permutations. L'utilisation de cette méthode statistique non paramétrique est libre des postulats de base normalement requis avec des statistiques paramétriques (normalité multivariée ou égalité des variances).

Tout comme les analyses conventionnelles de la variance, la perMANOVA calcule une statistique F basée sur les valeurs de dissimilarité au sein et entre les groupements. Plus l'indice F est élevé, plus de différences existent entre les groupes.

Le test utilise la distance de Bray-Curtis entre les échantillons ainsi que la permutation des données pour produire la *p-value* nécessaire à l'interprétation du test en détectant ou non une différence significative.

### 2.6.3.3. Analyse des composés indicateurs

Pour identifier les composés qui sont exclusivement présents dans chaque espèce, une analyse de composés indicateurs basée sur le principe de l'IndVal a été réalisée. Cette analyse, habituellement utilisée avec des données d'espèces, peut être appliquée de la même manière aux données chimiques.

Ce test calcule la probabilité d'un composé à être trouvé en association avec un échantillon d'une espèce donnée ou d'une origine géographique bien précise selon le type de matrice. Une valeur indicatrice – qui est fonction de l'abondance et fréquence relative du composé – est calculée pour chaque composé chimique (acide aminé ou stérol) et permet d'identifier pour chaque échantillon, le composé avec la plus grande valeur indicatrice. Une *p-value* est également calculée pour chaque combinaison composé/échantillon afin d'évaluer si certains composés sont significativement indicateurs. Les valeurs de *p-value* sont ajustées en utilisant la correction de Holm pour éviter l'augmentation de l'erreur type I due aux analyses multiples.

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyses palynologiques

Pour les échantillons récoltés lors de cette étude, les charges de pollen transportées par les femelles d'*Andrena vaga* sont composées exclusivement de *Salix* sp. Cependant, quelques grains de pollen de *Prunus* sp. ont été observés au sein de certaines charges de pollen. Toutefois, vu leur très faible densité, cela est considéré comme une contamination (pourcentage < 5%). Seules les charges scopales d'un individu (5.3, *Annexe 2*) de la station Grèce (S05, *Annexe 1*) comportaient 5.51% de pollen de *Prunus* sp.



**Figure 25 :** pollen scopal d'*Andrena vaga* composé exclusivement de grains de *Salix* sp.  
(source : Carreaux Gaëlle)

Les charges scopales analysées provenant des spécimens de collections sont également composées exclusivement de grains de pollen de *Salix* sp. (*Annexe 3*).

*Andrena vaga* est donc oligolectique sur *Salix* sp. sur l'ensemble des stations considérées (*Annexe 1 et 3*, *Table 9 et 11*).

## 3.2. Analyses chimiques

### 3.2.1. Analyses stéroliques

Au cours de cette étude, 58 échantillons ont été analysés. Sur base des chromatogrammes obtenus grâce à l'analyse par CPG, les profils stéroliques ont été décrits pour chacun des échantillons (quantifications relative et absolue pour chaque composé détecté entre le cholestérol et la bétuline). Toutes matrices confondues, 11 composés stéroliques ont été détectés. Les tables de composition stérolique ainsi que les chromatogrammes représentatifs pour chacune des matrices sont repris ci-dessous (*Table 4, 5 et 6 ; Fig. 30, 31 et 32*).

Des tests multivariés sont réalisés sur les différents pollens floraux, scopaux et sur les femelles d'*Andrena vaga*. Des analyses de type IndVal ont ensuite permis de détecter si certains stérols étaient indicateurs des sites de collecte ou du type de matrice investiguée.

#### 3.2.1.1. Femelles d'*Andrena vaga*

##### 1 – Tissus des femelles

Les stérols les plus représentés dans les tissus des femelles sont le  $\beta$ -sitostérol, le  $\Delta^5$ -avénastérol, l'érythrodiol et la fraction campesterol/24-méthylènecholestérol.

Les femelles de la station Malassis S03 présentent la plus grande quantité de  $\beta$ -sitostérol (40.04%) et les femelles de la station Flines S02, la plus petite (35.31%).

La proportion de  $\Delta^5$ -avénastérol est relativement stable parmi les femelles provenant des différentes stations. Le plus grand pourcentage de  $\Delta^5$ -avénastérol est retrouvé chez les femelles de la station Malassis S03 (34.97%). Le plus bas pourcentage se retrouve chez les femelles de la station Tertre S04 (33.36%).

Le pourcentage d'érythrodiol varie de 7.53% chez les femelles de la station Malassis S03 à 13.25% chez les femelles de la station Flines S02.

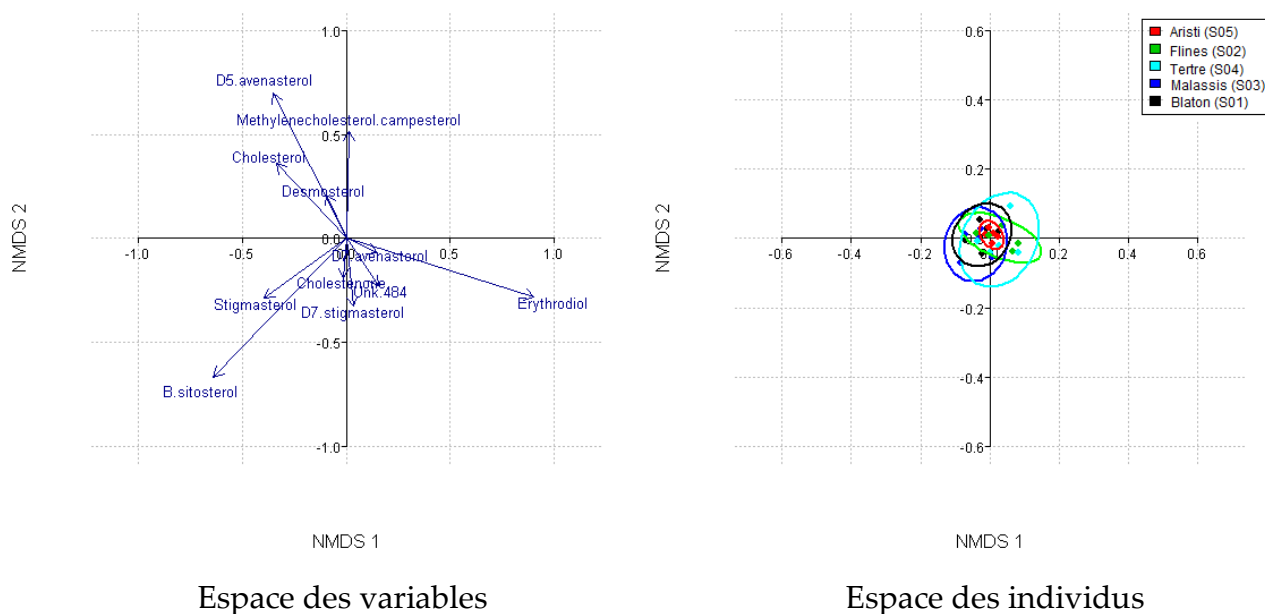
La fraction campesterol/24-méthylènecholestérol représente 10.85% des stérols totaux chez les femelles de la station Malassis S03 et 12.47% chez les femelles de la station Tertre S04.

La teneur en stérols totaux au sein des tissus des femelles passe de 1350.01 µg/g de matière fraîche pour la station Flines S02 à 1932.80 µg/g de matière fraîche pour la station Aristi S05.

**Table 4 : Composition stérolique des tissus des femelles d'*Andrena vaga*.** Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux comprend tous les pics du chromatogramme dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/g de matière fraîche. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). La valeur indiquée représente la moyenne des cinq échantillons analysés (n=5), accompagnée de l'écart-type. Pour les codes relatifs aux stations, voir en annexe 1. (MF = matière fraîche, 24-Méth.Chol.+Camp. = 24-méthylène cholestérol + campesterol).

| Stérols                                  | Femelles d' <i>Andrena vaga</i> |                          |                          |                            |                          |
|------------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
|                                          | ♀ <i>Flines</i><br>(S02)        | ♀ <i>Tertre</i><br>(S04) | ♀ <i>Blaton</i><br>(S01) | ♀ <i>Malassis</i><br>(S03) | ♀ <i>Aristi</i><br>(S05) |
|                                          | $\bar{X} \pm sd$                | $\bar{X} \pm sd$         | $\bar{X} \pm sd$         | $\bar{X} \pm sd$           | $\bar{X} \pm sd$         |
| Cholestérol                              | 1.69 ± 0.45                     | 1.38 ± 0.25              | 2.40 ± 0.86              | 1.91 ± 0.33                | 2.38 ± 0.63              |
| Desmostérol                              | 1.54 ± 1.27                     | 0.75 ± 0.25              | 2.16 ± 0.84              | 1.11 ± 0.44                | 1.43 ± 0.25              |
| 24-Méth. Chol.+Camp.                     | <b>10.93 ± 0.99</b>             | <b>12.47 ± 4.66</b>      | <b>11.95 ± 0.94</b>      | <b>10.85 ± 1.65</b>        | <b>11.13 ± 0.54</b>      |
| Stigmastérol                             | 0.83 ± 0.49                     | 0.61 ± 0.26              | 1.25 ± 1.21              | 1.23 ± 1.39                | 0.97 ± 0.61              |
| Inconnu 484                              | 1.09 ± 0.16                     | 1.04 ± 0.18              | 1.13 ± 0.25              | 1.01 ± 0.22                | 1.12 ± 0.17              |
| B-Sitostérol                             | <b>35.31 ± 2.19</b>             | <b>36.14 ± 4.39</b>      | <b>36.52 ± 2.01</b>      | <b>40.04 ± 2.61</b>        | <b>36.37 ± 0.93</b>      |
| Δ5-Avémostérol                           | <b>33.84 ± 2.56</b>             | <b>33.36 ± 2.15</b>      | <b>34.93 ± 1.85</b>      | <b>34.97 ± 3.10</b>        | <b>34.59 ± 0.95</b>      |
| Cholesténone                             | 0.72 ± 0.23                     | 0.68 ± 0.20              | 0.82 ± 0.45              | 0.62 ± 0.17                | 0.72 ± 0.16              |
| Δ7-Stigmastérol                          | 0.16 ± 0.18                     | 0.13 ± 0.12              | 0.00 ± 0.00              | 0.12 ± 0.15                | 0.00 ± 0.00              |
| Δ7-Avémostérol                           | 0.65 ± 0.23                     | 0.80 ± 0.26              | 0.68 ± 0.32              | 0.60 ± 0.11                | 0.70 ± 0.32              |
| Erythrodiol                              | <b>13.25 ± 4.55</b>             | <b>12.65 ± 3.86</b>      | <b>8.15 ± 2.85</b>       | <b>7.53 ± 3.19</b>         | <b>10.60 ± 1.35</b>      |
| Teneur en stérols totaux (en µg/g de MF) | 1350.01 ± 93.32                 | 1597.63 ± 388.99         | 1519.29 ± 295.06         | 1653.09 ± 285.79           | 1932.80 ± 328.53         |

La représentation d'ordination montrent que les ellipses se superposent au centre de l'espace NMDS suggérant que les compositions stéroliques tissulaires des femelles restent identiques quelque soit la station (*stress value* = 0.1626, Fig. 26). Cette observation graphique est étayée par le test de la perMANOVA qui, pourtant très sensible, ne détecte aucune différence significative entre les compositions stéroliques ( $F = 1.71, p = 0.055$ ).



**Figure 26 :** Ordination nMDS des femelles d'*Andrena vaga* réparties selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). A gauche, l'espace des variables et à droite, l'espace des individus. Chaque vecteur représente une variable qualitative (en l'occurrence, un composé stérolique) tandis que chaque point représente un individu. Les distances reflètent la dissimilarité entre les individus, plus la distance entre les points est importante, plus la composition stérolique entre les deux individus diffère. Pour les codes relatifs aux stations, voir en Annexe 1.

## 2 – Pollen scopal

Les stérols les plus abondants sont l'érythrodiol, le  $\beta$ -sitostérol et le  $\Delta^5$ -avénastérol.

Le pollen scopal provenant de la station Aristi S05 contient la plus grande quantité d'érythrodiol (46.31%). Cependant, cette valeur est à considérer avec précaution car une seule analyse a pu être réalisée sur ce pollen. Le pollen scopal contenant la quantité la plus faible en érythrodiol est celui de la station Tertre S04 (21.51%).

Concernant le  $\beta$ -sitostérol, le plus haut pourcentage est observé pour le pollen scopal de la station Flines S02 (36.12%) et le plus bas pourcentage pour le pollen scopal provenant de la station Blaton S01 (29.76%).

Pour le  $\Delta 5$ -avénastérol, le pollen scopal de la station Tertre S04 en possède la plus grande quantité (29.57%). La plus petite quantité en  $\Delta 5$ -avénastérol est retrouvée dans le pollen scopal récolté sur la station Aristi S04 (19.21%).

La teneur en stérols totaux varie de 11801.20  $\mu\text{g/g}$  de matière lyophilisée pour le pollen scopal de la station Blaton S01 à 22917.57  $\mu\text{g/g}$  de matière lyophilisée pour le pollen scopal de la station Tertre S04.

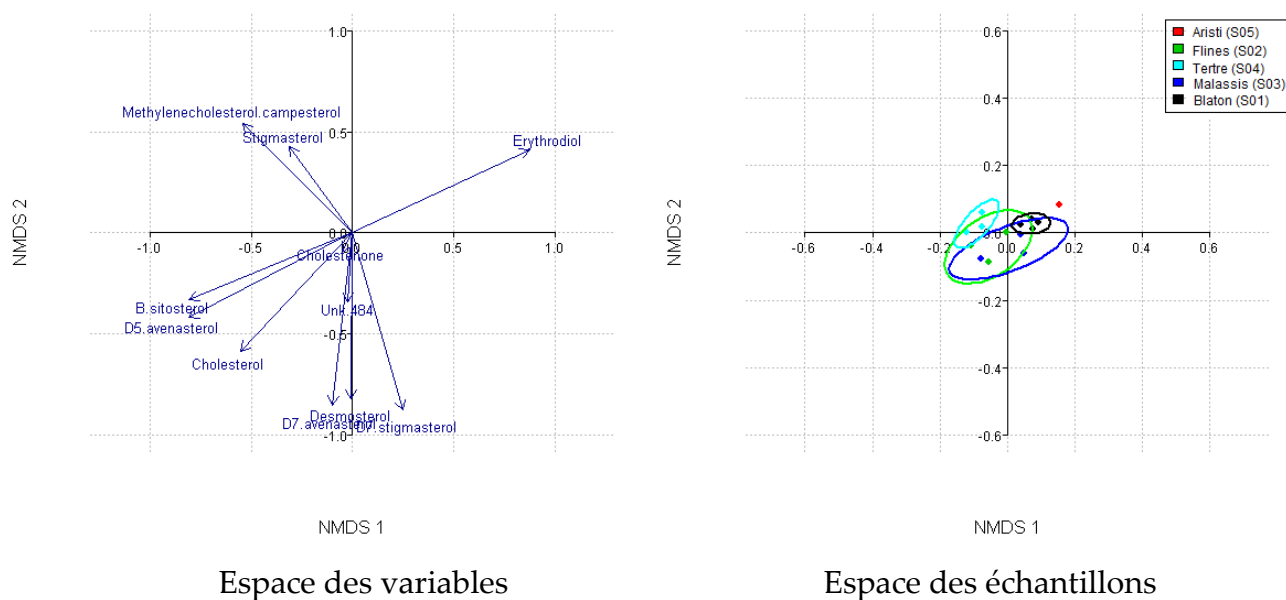
**Table 5: Composition stérolique du pollen scopal.** Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux comprend tous les pics du chromatogramme dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. La teneur en stérols totaux est exprimée en  $\mu\text{g/g}$  de pollen lyophilisé. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). La valeur indiquée représente la moyenne des trois analyses effectuées par échantillon (n=3), accompagnée de l'écart-type. Pour le pollen scopal provenant de la station Aristi S05 en Grèce, la quantité de pollen récoltée n'était suffisante que pour effectuer une seule analyse (n=1). Pour le pollen scopal provenant de la station Blaton S01, n=4. Pour les codes relatifs aux stations, voir en annexe 1. (ML = matière lyophilisée, 24-Méth.Chol.+Camp. = 24-méthylène cholestérol + campestérol).

| Stérols                                             | Pollen scopal                      |                                    |                                    |                                    |                        |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------|
|                                                     | <i>Flines</i><br>(S02)             | <i>Tertre</i><br>(S04)             | <i>Blaton</i><br>(S01)             | <i>Malassis</i><br>(S03)           | <i>Aristi</i><br>(S05) |
|                                                     | $\bar{X} \pm \text{sd}$            | $\bar{X} \pm \text{sd}$            | $\bar{X} \pm \text{sd}$            | $\bar{X} \pm \text{sd}$            |                        |
| Cholestérol                                         | 1.48 $\pm$ 0.32                    | 1.37 $\pm$ 0.12                    | 0.95 $\pm$ 0.16                    | 1.15 $\pm$ 0.24                    | 0.59                   |
| Desmostérol                                         | 1.68 $\pm$ 0.91                    | 1.59 $\pm$ 0.20                    | 1.26 $\pm$ 0.48                    | 2.78 $\pm$ 0.54                    | 0.47                   |
| 24-Méth.Chol.+Camp.                                 | 2.35 $\pm$ 0.15                    | 3.78 $\pm$ 0.04                    | 2.22 $\pm$ 0.12                    | 2.70 $\pm$ 0.03                    | 2.24                   |
| Stigmastérol                                        | 1.55 $\pm$ 1.19                    | 2.87 $\pm$ 3.22                    | 0.75 $\pm$ 0.40                    | 0.52 $\pm$ 0.19                    | 1.30                   |
| Inconnu 484                                         | 1.83 $\pm$ 0.07                    | 2.05 $\pm$ 0.13                    | 2.14 $\pm$ 0.13                    | 2.51 $\pm$ 0.67                    | 1.89                   |
| $\beta$ -Sitostérol                                 | <b>36.12 <math>\pm</math> 4.05</b> | <b>34.14 <math>\pm</math> 2.51</b> | <b>29.76 <math>\pm</math> 0.78</b> | <b>32.81 <math>\pm</math> 4.18</b> | <b>26.52</b>           |
| $\Delta 5$ -Avénastérol                             | <b>25.92 <math>\pm</math> 0.87</b> | <b>29.57 <math>\pm</math> 1.70</b> | <b>22.46 <math>\pm</math> 1.64</b> | <b>23.13 <math>\pm</math> 1.13</b> | <b>19.21</b>           |
| Cholesténone                                        | 1.06 $\pm$ 0.23                    | 1.19 $\pm$ 0.11                    | 1.42 $\pm$ 0.82                    | 1.33 $\pm$ 0.25                    | 0.57                   |
| $\Delta 7$ -Stigmastérol                            | 1.15 $\pm$ 0.75                    | 0.12 $\pm$ 0.12                    | 0.75 $\pm$ 0.33                    | 1.86 $\pm$ 0.34                    | 0.34                   |
| $\Delta 7$ -Avénastérol                             | 3.85 $\pm$ 2.35                    | 1.81 $\pm$ 0.56                    | 1.75 $\pm$ 0.23                    | 4.13 $\pm$ 2.36                    | 0.55                   |
| Erythrodiol                                         | <b>23.01 <math>\pm</math> 6.20</b> | <b>21.51 <math>\pm</math> 2.40</b> | <b>36.53 <math>\pm</math> 2.45</b> | <b>27.09 <math>\pm</math> 6.87</b> | <b>46.31</b>           |
| Teneur en stérols totaux (en $\mu\text{g/g}$ de ML) | 16339.66 $\pm$ 2551.34             | 22917.57 $\pm$ 2.61                | 11801.20 $\pm$ 839.22              | 14055.58 $\pm$ 3370.06             | 14558.70               |

Bien que les ellipses soient à nouveau centrées sur le graphique nMDS, elles ne se superposent plus parfaitement les unes sur les autres. L'ordination nMDS sépare les différents pollens scopaux qui s'étalent le long de l'axe 1 (NMDS 1) (*stress value* = 0.0797 ; Fig. 27).

La variabilité du pollen collecté à Blaton est plus faible comme en témoigne le tracé de l'ellipse plus étroite. Le point représentant l'échantillon provenant de la station Aristi est décentré par rapport aux autres échantillons. Cependant, comme cité auparavant, ce résultat doit être interprété avec prudence car il s'agit d'une mesure unique.

L'analyse perMANOVA détecte une différence significative entre les compositions stéroliques des différentes charges scopales d'*Andrena vaga* selon les stations ( $F = 6.97$ ,  $p = 0.000999$  \*\*\*). Cette variation de la composition stérolique est principalement définie par l'érythrodiol et le  $\beta$ -sitostérol selon l'axe 1 et par le desmostérol selon l'axe 2 (Fig. 27). Cependant, aucun de ces composés ne peut être statistiquement considérés comme composé indicateur.



**Figure 27 :** Ordination nMDS des différents pollens scopaux répartis selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). A gauche, l'espace des variables et à droite, l'espace des échantillons. Chaque vecteur représente une variable qualitative (en l'occurrence, un composé stérolique) tandis que chaque point représente un échantillon de pollen scopal. Les distances reflètent la dissimilarité entre les échantillons, plus la distance entre les points est importante, plus la composition stérolique entre les deux échantillons diffère. Pour les codes relatifs aux stations, voir en Annexe 1.

### 3.2.1.2. Ressources alimentaires

La teneur en stérols totaux est comprise entre 10994.48 µg/g de matière lyophilisée pour *Salix x rubens* et 14650.86 µg/g de matière lyophilisée pour *Salix viminalis*.

L'érythrodiol est un des stérols majeurs retrouvés dans le pollen de *Salix* sp. L'espèce de saule comprenant la plus grande teneur en érythrodiol est *Salix x rubens* (47.57%), suivi par *Salix caprea* S02 (38.90%), *Salix caprea* S03 (36.13%), *Salix atrocinerea* (36.10%), *Salix viminalis* (32.22%) et *Salix caprea* S01 (24.50%). *Salix alba* est l'espèce présentant le pourcentage en érythrodiol le plus bas (19%).

Les deux autres stérols majeurs présents dans le pollen de *Salix* sp. sont des stérols à 29 carbones. Soit le  $\Delta^5$ -avénastérol et le  $\beta$ -sitostérol, ce dernier étant généralement plus abondant. Dans ce cas-ci, c'est *Salix alba* qui possède la plus grande proportion de  $\beta$ -sitostérol (41.16%). Le pourcentage de  $\beta$ -sitostérol présent chez *Salix atrocinerea* est de 35.40%, de 32.26% chez *Salix viminalis*, et de 25.44% chez *Salix x rubens*. Concernant *Salix caprea*, l'échantillon récolté sur la station Blaton S01 comprend 34.04% de  $\beta$ -sitostérol, 23.56% pour l'échantillon de la station Flines S02, et 25.40% pour *Salix caprea* récolté sur la station Malassis S03.

Au niveau du  $\Delta^5$ -avénastérol, le plus haut pourcentage est observé chez *Salix caprea* S01 (30.57%) et le plus bas pourcentage chez *Salix x rubens* (17.07%).

La fraction campestérol/24-méthylènecholestérol représente 2.06 à 3.41% des stérols totaux selon l'espèce considéré.

*A priori*, les profils stéroliques des pollens floraux de *Salix* sp. sont fort semblables à ceux des pollens scopaux.

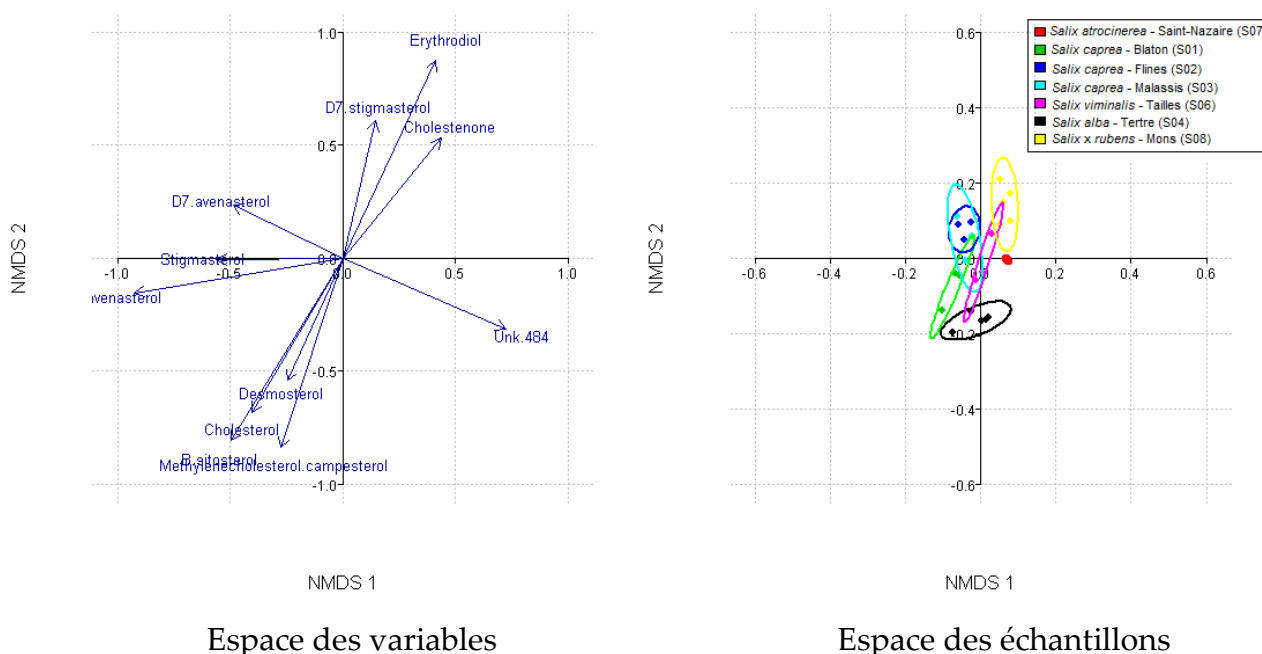
**Table 6 : Composition stérolique du pollen des différents échantillons de saule.** Les stérols sont exprimés en % de stérols totaux. La teneur en stérols totaux comprend tous les pics du chromatogramme dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. La teneur en stérols totaux est exprimée en µg/g de pollen lyophilisé. En gras, les stérols les plus représentés (>5%). La valeur indiquée représente la moyenne des trois analyses effectuées par échantillon (n=3), accompagnée de l'écart-type. Le pollen de *Salix x rubens* a été analysé en cinq échantillons (n=5). Pour les codes relatifs aux stations, voir en annexe 1. (ML = matière lyophilisée, 24-Méth.Chol.+Camp. = 24-méthylène cholestérol + campestérol).

| <b>Stérols</b>                           | <b><i>Salix atrovirens</i><br/>(St-Nazaire - S07)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix alba</i><br/>(Tertre - S04)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix viminalis</i><br/>(Tailles - S06)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix x rubens</i><br/>(Mons - S08)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix caprea</i><br/>(Flines - S02)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix caprea</i><br/>(Malassis - S03)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ | <b><i>Salix caprea</i><br/>(Blaton - S01)</b><br>$\bar{X} \pm sd$ |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Cholestérol                              | 0.69 ± 0.08                                                               | 1.15 ± 0.19                                                     | 1.09 ± 0.23                                                           | 0.55 ± 0.24                                                       | 0.69 ± 0.07                                                       | 0.97 ± 0.23                                                         | 1.04 ± 0.33                                                       |
| Desmostérol                              | 0.71 ± 0.07                                                               | 3.94 ± 2.54                                                     | 0.85 ± 0.26                                                           | 0.02 ± 0.01                                                       | 0.65 ± 0.29                                                       | 1.73 ± 1.03                                                         | 0.84 ± 0.18                                                       |
| 24-Méth.Chol.+Camp                       | 2.53 ± 0.15                                                               | 3.35 ± 0.34                                                     | 3.07 ± 0.39                                                           | 2.06 ± 0.21                                                       | 2.14 ± 0.25                                                       | 2.57 ± 0.43                                                         | 3.41 ± 0.45                                                       |
| Stigmastérol                             | 0.48 ± 0.25                                                               | 0.42 ± 0.24                                                     | 0.58 ± 0.28                                                           | 0.05 ± 0.07                                                       | 0.50 ± 0.15                                                       | 0.95 ± 0.49                                                         | 0.67 ± 0.17                                                       |
| Inconnu 484                              | 2.99 ± 0.10                                                               | 2.50 ± 0.15                                                     | 1.73 ± 0.19                                                           | 1.70 ± 0.13                                                       | 1.46 ± 0.22                                                       | 1.52 ± 0.08                                                         | 1.01 ± 0.11                                                       |
| β-Sitostérol                             | <b>35.40 ± 0.50</b>                                                       | <b>41.16 ± 2.42</b>                                             | <b>32.26 ± 3.05</b>                                                   | <b>25.44 ± 2.88</b>                                               | <b>23.56 ± 1.89</b>                                               | <b>25.40 ± 4.29</b>                                                 | <b>34.04 ± 3.03</b>                                               |
| Δ5-Avémostérol                           | <b>18.59 ± 0.36</b>                                                       | <b>26.30 ± 1.68</b>                                             | <b>22.35 ± 2.17</b>                                                   | <b>17.07 ± 1.85</b>                                               | <b>27.38 ± 1.37</b>                                               | <b>25.78 ± 1.06</b>                                                 | <b>30.57 ± 1.96</b>                                               |
| Cholesténone                             | 1.01 ± 0.16                                                               | 1.12 ± 0.19                                                     | 2.52 ± 0.25                                                           | 2.98 ± 1.82                                                       | 2.28 ± 0.77                                                       | 2.57 ± 1.53                                                         | 1.52 ± 0.20                                                       |
| Δ7-Stigmastérol                          | 0.47 ± 0.11                                                               | 0.24 ± 0.18                                                     | 0.87 ± 0.37                                                           | 1.12 ± 0.73                                                       | 0.49 ± 0.31                                                       | 0.81 ± 0.24                                                         | 0.52 ± 0.04                                                       |
| Δ7-Avémostérol                           | 1.02 ± 0.14                                                               | 0.82 ± 0.09                                                     | 2.45 ± 0.32                                                           | 1.46 ± 0.65                                                       | 1.95 ± 0.16                                                       | 1.58 ± 0.31                                                         | 1.86 ± 0.28                                                       |
| Erythrodiol                              | <b>36.10 ± 0.27</b>                                                       | <b>19.00 ± 2.60</b>                                             | <b>32.22 ± 6.51</b>                                                   | <b>47.57 ± 3.44</b>                                               | <b>38.90 ± 2.23</b>                                               | <b>36.13 ± 3.87</b>                                                 | <b>24.50 ± 6.31</b>                                               |
| Teneur en stérols totaux (en µg/g de ML) | 11538.52 ± 258.22                                                         | 11598.62 ± 1422.27                                              | 14650.86 ± 2205.80                                                    | 10994.48 ± 864.82                                                 | 12988.65 ± 1562.28                                                | 12723.97 ± 1526.07                                                  | 12445.35 ± 3604.37                                                |

L'ordination nMDS montre que les différents lots de pollen de *Salix* sp. sont distribués le long de l'axe 2 (NMDS 2) (*stress value* : 0.0536 ; Fig. 28). Cette séparation est principalement due au  $\Delta 7$ -stigmastérol, à l'érythrodiol et à la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol.

*Salix viminalis*, *Salix caprea* – station Blaton S01 – et *Salix alba* présentent une proportion plus grande en cholestérol et en fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol expliquant leur localisation tirée vers le bas d'espace des individus. *Salix x rubens* est en partie définie par un pourcentage plus élevé en érythrodiol et en  $\Delta 7$ -stigmastérol et sont localisés dans la partie supérieure de l'ordination. Les ellipses assez étendues pour certaines espèces de saule témoignent d'une variabilité entre les différentes mesures.

Bien qu'aucun phénomène de présence/absence de composé ne soit observé, la perMANOVA détecte une différence significative de composition du pollen entre les différents espèces florales ( $F = 20.46$ ,  $p = 0.000999^{***}$ ). L'analyse de composés indicateurs ne révèle aucun stérol indicateur d'une espèce particulière de saule.



**Figure 28 :** Ordination nMDS des différents pollens floraux de *Salix* sp. réparties selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). A gauche, l'espace des variables et à droite, l'espace des échantillons. Chaque vecteur représente une variable qualitative (en l'occurrence, un composé stérolique) tandis que chaque point représente un échantillon. Les distances reflètent la dissimilarité entre les échantillons, plus la distance entre les points est importante, plus la composition stérolique entre les deux échantillons diffère. Pour les codes relatifs aux stations, voir en Annexe 1.

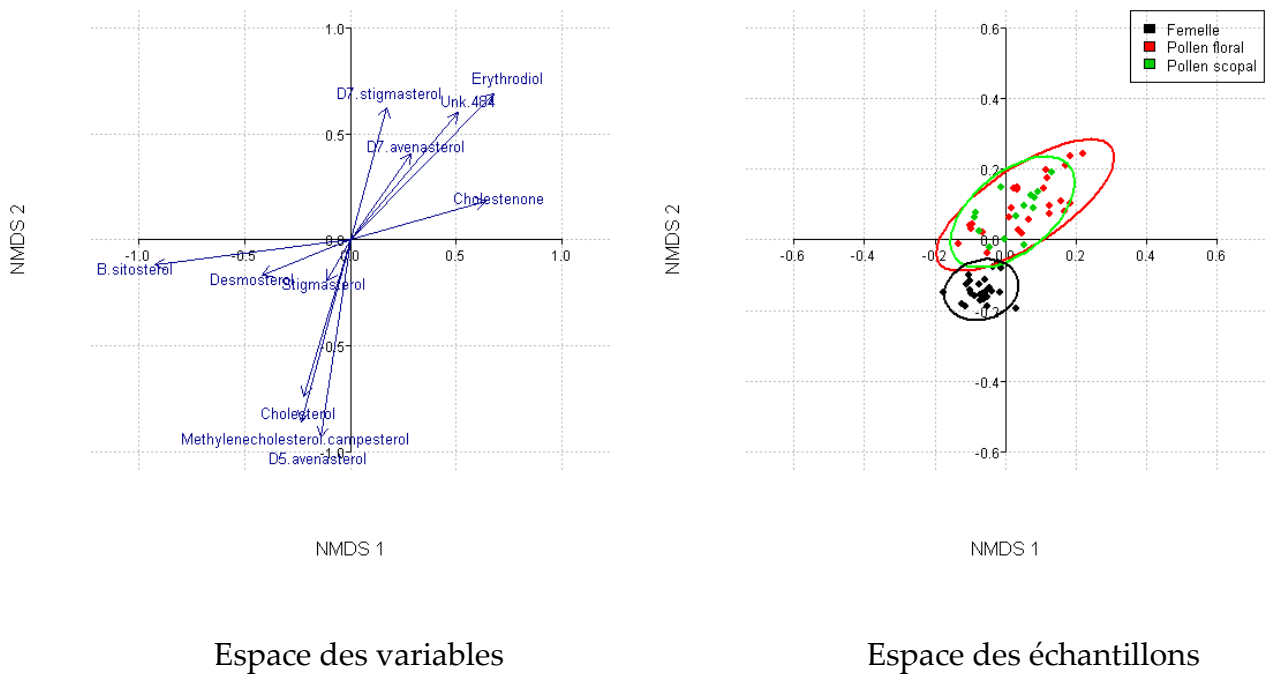
### 3.2.1.3. Global

L'ordination nMDS sépare les données en deux groupes selon l'axe NMDS 2 : (i) un groupe composé des échantillons de pollen floral et scopal et (ii) un second groupe composé des femelles d'andrènes (*stress value* = 0.063 ; Fig. 29). Le pollen floral et le pollen scopal se superposant parfaitement, leurs compositions stéroliques peuvent être considérées comme similaires. A l'inverse, les femelles d'*Andrena vaga* forment un ensemble bien distinct de ceux délimités par les échantillons de pollen. Leur composition stérolique tissulaire diffère donc de celle des échantillons de pollen. Toutefois, l'ellipse des femelles est plus ronde et petite que les ellipses basées sur les échantillons de pollen. Leur composition stérolique est donc hautement conservée tandis que les pollens arborent plus de variabilité au niveau de leurs compositions stéroliques.

Par interprétation de l'espace des échantillons couplé à l'espace des variables, on peut déterminer que la différence pollen/femelle est principalement définie par le  $\Delta 7$ -stigmastérol, le  $\Delta 5$ -avénastérol et la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol. Ce résultat est confirmé par la perMANOVA qui détecte une différence significative de compositions entre les échantillons ( $F = 51.34$ ,  $p = 0.000999$  \*\*\*).

L'ensemble regroupant les femelles est légèrement décentré de l'axe 1 en étant influencé par le cholestérol, la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol et le  $\Delta 5$ -avénastérol. Les valeurs de ces 3 stérols sont plus élevées dans les tissus des femelles que dans le pollen floral et scopal. Sur le graphe, la disposition du pollen floral et scopal est définie principalement par l'érythrodiol et le  $\Delta 7$ -avénastérol qui sont plus représentés dans le pollen comparé aux tissus des femelles.

L'analyse de composés indicateurs montre que la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol est significativement associée aux femelles d'andrènes ( $p = 0.011$ , valeur indicatrice = 67.92).



**Figure 29 :** Ordination nMDS globale des différentes matrices (pollen floral/pollen scopal/ femelles d'*Andrena vaga*) réparties selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). A gauche, l'espace des variables et à droite, l'espace des échantillons. Chaque vecteur représente une variable qualitative (en l'occurrence, un composé stérolique) tandis que chaque point représente un échantillon. Les distances reflètent la dissimilarité entre les échantillons, plus la distance entre les points est importante, plus la composition stérolique entre les deux individus diffère.

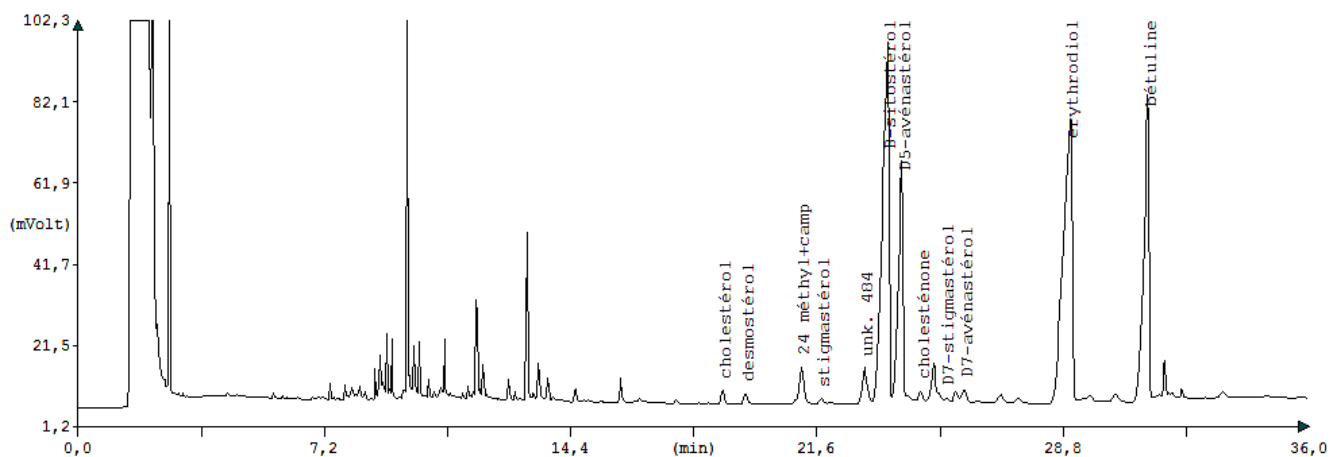


Figure 30 : Chromatogramme d'un échantillon de pollen floral de *Salix atrocinerea*

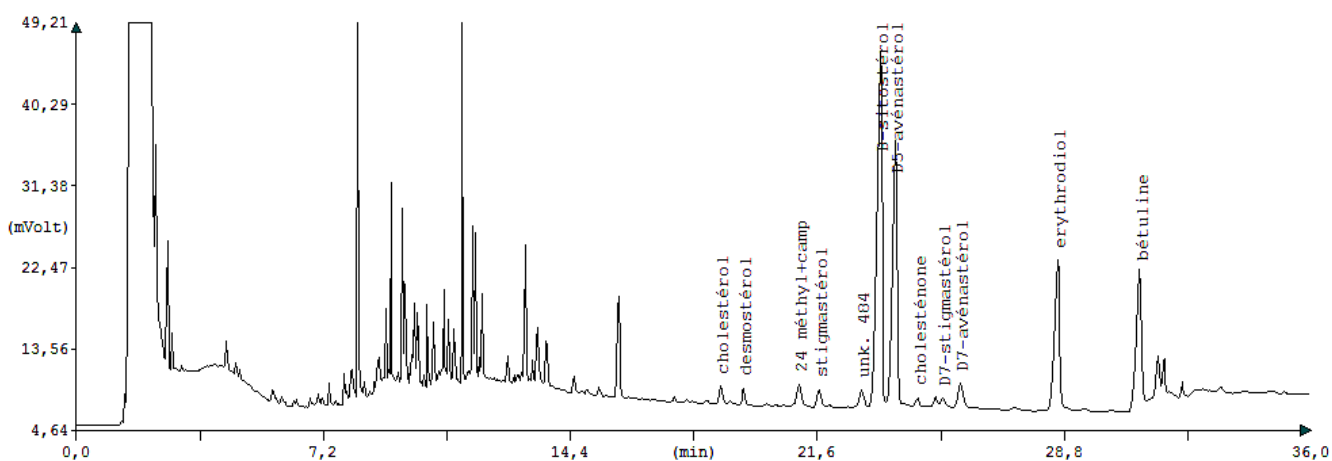


Figure 31 : Chromatogramme d'un échantillon de pollen scopal d'*Andrena vaga* récolté sur la station Flines (S02)

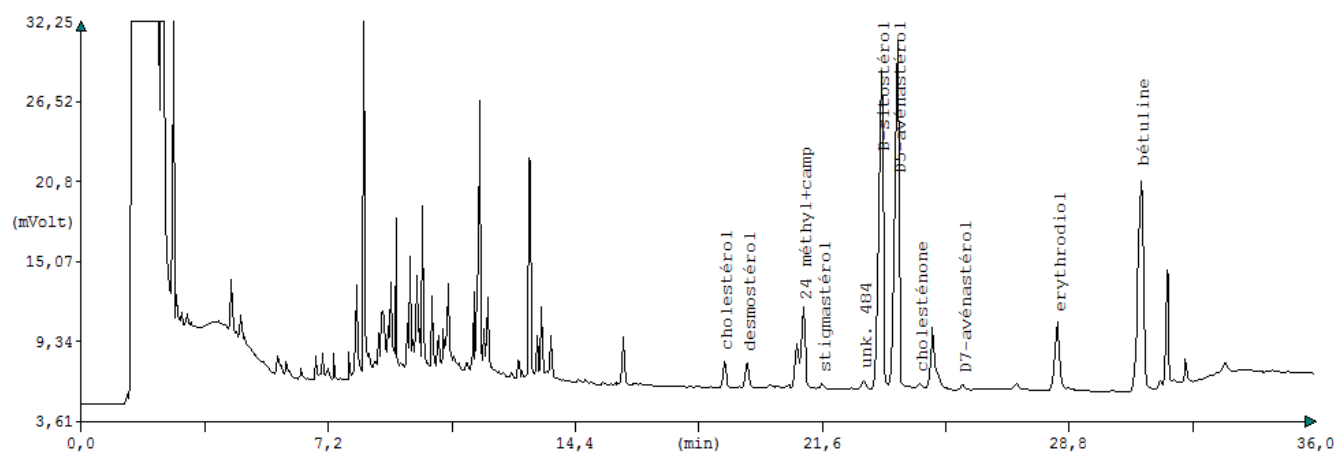


Figure 32 : Chromatogramme de femelle d'*Andrena vaga* récolté sur la station Blaton (S01 ; 1.16)

### 3.2.2. Analyses protéiques

#### 3.2.2.1. Ressources alimentaires

Le contenu en protéine brute est, par ordre décroissant, de 20.47% pour *Salix x rubens*, de 18.97% pour *Salix alba*, de 18.42% pour *Salix caprea* Blaton S01, de 12.46% pour *Salix caprea* Flines S02, de 11.77% pour *Salix viminalis* et de 11.33% pour *Salix caprea* Malassis S03. L'espèce *Salix atrocinerea* possède un pourcentage de protéines inférieur aux autres espèces de saules. Il est de 7.07% pour l'échantillon récolté à Saint-Nazaire (S07) et de 3.17% pour l'échantillon provenant de Koolkerke (S09). Même en considérant les écarts-types, ces valeurs restent nettement inférieures à celles observées pour les autres espèces (*Table 7*).

Au niveau de *Salix caprea*, les taux en protéines diffèrent. L'échantillon de *Salix caprea* provenant de la station Blaton S01 présente le plus haut pourcentage en protéines (18.42%). Les deux autres échantillons, *Salix caprea* récoltés sur la station Flines S02 et Paris S03, ont des taux en protéines similaires (*Table 7*).

**Table 7: Composition protéique du pollen des différents échantillons de saule.** La concentration en protéines totales est exprimée en µg/mg de pollen lyophilisé. La valeur indiquée représente la moyenne des trois analyses effectuées par échantillon (n=3), accompagnée de l'écart-type. Pour les codes relatifs aux stations, voir en annexe 1. (ML = matière lyophilisée).

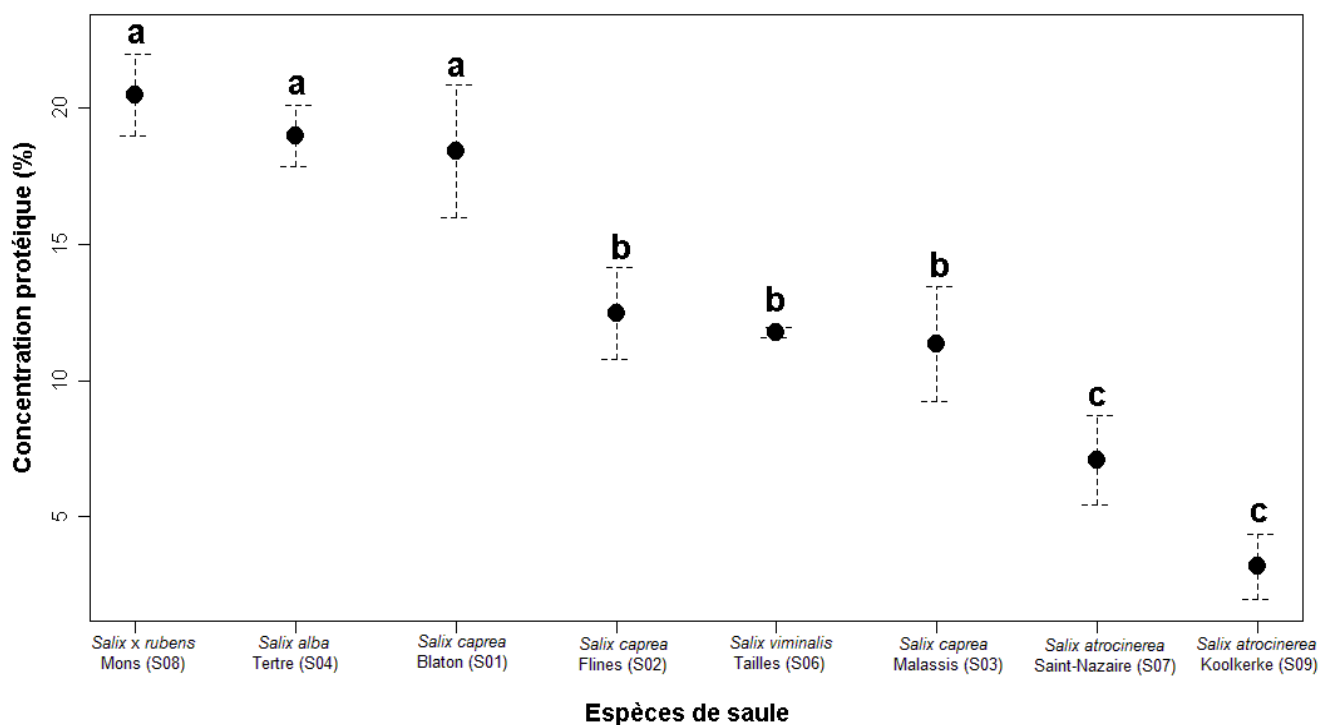
| Protéines                                           | Espèces florales                                                        |                                                                  |                                                        |                                                              |                                                          |                                                          |                                                            |                                                          |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                                                     | <i>Salix atrocinerea</i><br>(Saint-Nazaire,<br>S07)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix atrocinerea</i><br>(Koolkerke, S09)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix alba</i><br>(Tertre, S04)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix viminalis</i><br>(Tailles, S06)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix x rubens</i><br>(Mons, S08)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix caprea</i><br>(Flines, S02)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix caprea</i><br>(Malassis, S03)<br>$\bar{X} \pm sd$ | <i>Salix caprea</i><br>(Blaton, S01)<br>$\bar{X} \pm sd$ |
| Concentration en protéines totales (en µg/mg de ML) | 70.71 ± 16.43                                                           | 31.71 ± 11.82                                                    | 189.71 ± 11.28                                         | 117.67 ± 1.65                                                | 204.71 ± 14.85                                           | 124.55 ± 16.87                                           | 113.34 ± 21.12                                             | 184.15 ± 24.28                                           |
| Pourcentage en protéines totales (%)                | 7.07 ± 1.64                                                             | 3.17 ± 1.18                                                      | 18.97 ± 1.13                                           | 11.77 ± 0.16                                                 | 20.47 ± 1.48                                             | 12.46 ± 1.69                                             | 11.33 ± 2.11                                               | 18.42 ± 2.43                                             |

La normalité des résidus (test de Shapiro,  $p = 0.5601$ ) et l'homoscédasticité (test de Bartlett,  $p = 0.3654$ ) étant respectées, une ANOVA a été réalisée sur les résultats du contenu en protéines des différents lots de pollen.

L'ANOVA détecte une différence significative au niveau de la composition protéique du pollen des différentes espèces de saule ( $F = 42.425$ ,  $p = 3.688.10^{-09}$  \*\*\*).

Les comparaisons multiples des moyennes définissent 3 groupes distincts (Fig. 33) : (i) un premier groupe composé des espèces *Salix x rubens*, *Salix alba* et *Salix caprea* Blaton et caractérisé par une concentration protéique élevée (de 18.42% à 20.47%) ; (ii) un deuxième groupe composé de *Salix viminalis* et *Salix caprea* de la station Flines et Malassis et caractérisé par une concentration protéique intermédiaire comprise entre 11.33% et 12.46% et (iii), un troisième et dernier groupe composés des deux échantillons de *Salix atrocinerea* et caractérisé par les plus basses quantités en protéines (7.07% et 3.17%).

Pour une même espèce, *Salix caprea*, les différents échantillons se retrouvent dans des groupes différents. Il existe donc une variabilité de la concentration protéique tant au niveau interspécifique que intraspécifique.



**Figure 33 :** Graphe des moyennes résumant les comparaisons multiples entre les différents lots de pollen de saule. Pour les codes relatifs aux stations, voir en Annexe 1.

### 3.2.2.2. Contenu protéique du pollen floral *versus* pollen scopal

Le pollen floral de *Salix caprea* récolté sur la station Blaton contient 18.42 % de protéines. Les charges scopales, directement récoltées sur les pattes d'*Andrena vaga* et provenant de la même station, présentent un pourcentage en protéines plus bas (13.72 %).

**Table 8 : Concentration protéique du pollen floral de *Salix caprea* et du pollen scopal d'*Andrena vaga* provenant de la station Blaton (S01).** La concentration en protéines totales est exprimée en µg/mg de pollen lyophilisé. La valeur indiquée représente la moyenne des trois analyses effectuées par échantillon (n=3), accompagnée de l'écart-type. (ML = Matière lyophilisée).

| Echantillon                                                | Concentration protéique<br>(en µg/mg de ML)<br>$\bar{x} \pm sd$ | Pourcentage (%)<br>$\bar{x} \pm sd$ |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Salix caprea</i> floral (Blaton)                        | 184.15 ± 24.28                                                  | 18.42 ± 2.43                        |
| <i>Salix caprea</i> scopal ( <i>Andrena vaga</i> , Blaton) | 137.17 ± 11.13                                                  | 13.72 ± 1.11                        |

### 3.2.3. Analyses des acides aminés totaux

Ces analyses ont été effectuées exclusivement sur le pollen floral des différentes espèces de saule récoltées. La proportion en acides aminés totaux de 8 échantillons de *Salix* sp. ont été analysés en triplicat (Table 8).

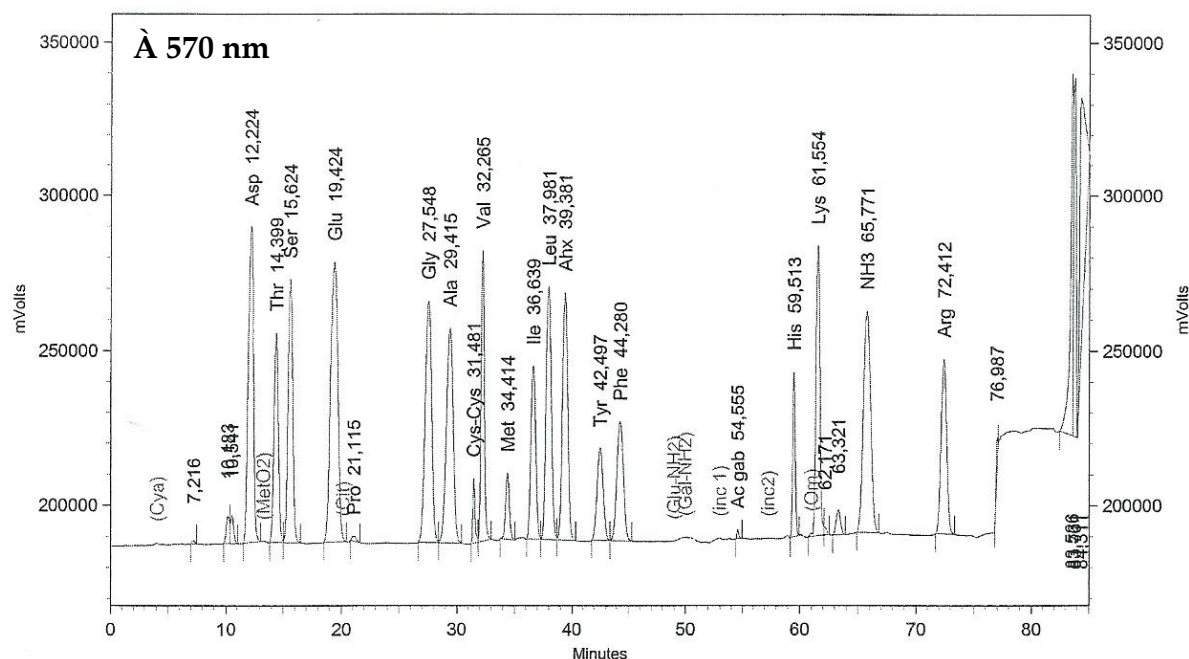
A première vue, les proportions relatives en chaque acide aminé sont très similaires au sein des différents échantillons de *Salix* sp. Tous les acides aminés essentiels pour l'abeille sont présents dans le pollen de saule. Le pourcentage en acides aminés essentiels varie de 50.84% pour *Salix x rubens* à 52.89% pour *Salix caprea* – station Flines (S02).

Les deux acides aminés les plus représentés (> à 10%) dans le pollen de *Salix* sp. sont des acides aminés non essentiels, l'acide glutamique et l'acide aspartique.

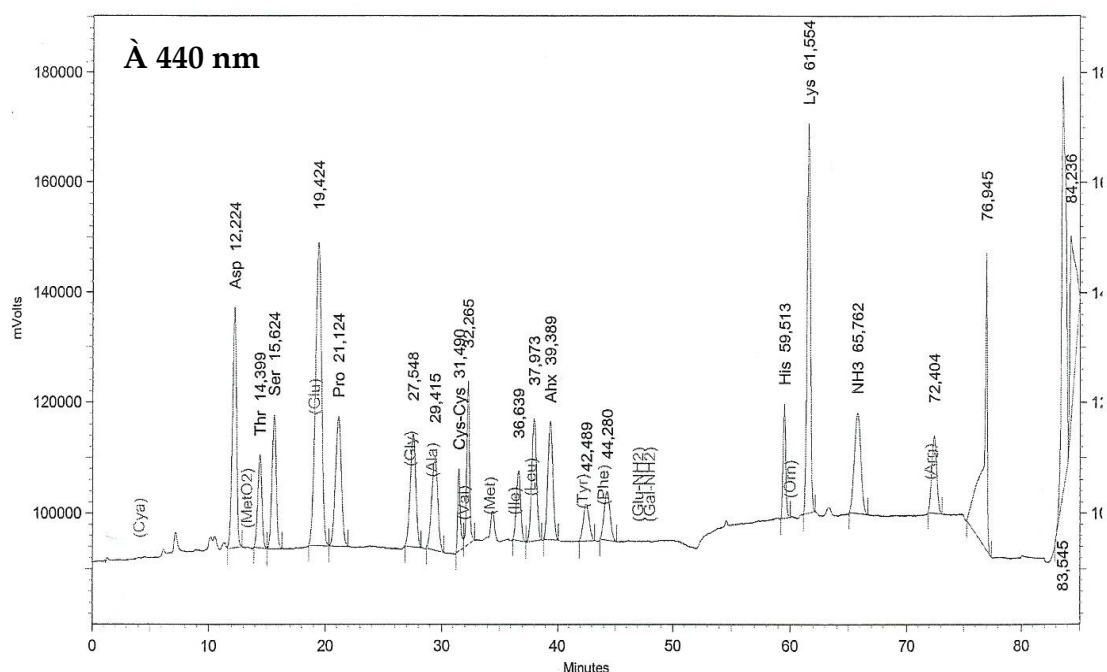
La quantité totale en acides aminés est comprise entre 326.97 mg/g de matière lyophilisée pour *Salix caprea* récolté sur la station Flines (S02) et 367.32 mg/g de matière lyophilisée pour *Salix caprea* provenant de Malassis (S03). Cette quantité varie donc au sein d'une même espèce.

**Table 8 : Composition en acides aminés du pollen des différents échantillons de saule.** Les acides aminés sont exprimés en % d'acides aminés totaux. La concentration en acides aminés totaux est exprimée en mg/g de pollen lyophilisé. La valeur indiquée représente la moyenne des trois analyses effectuées par échantillon (n=3), accompagnée de l'écart-type. Pour les codes relatifs aux stations, voir en annexe 1. (ML = matière lyophilisée ; ac. = acide ; AA = acides aminés).

| Acides aminés              | Espèces florales                                |                                             |                                    |                                          |                                      |                                      |                                      |                                        |
|----------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|
|                            | <i>Salix atrovirens</i><br>(Saint-Nazaire, S07) | <i>Salix atrovirens</i><br>(Koolkerke, S09) | <i>Salix alba</i><br>(Tertre, S04) | <i>Salix viminalis</i><br>(Tailles, S06) | <i>Salix x rubens</i><br>(Mons, S08) | <i>Salix caprea</i><br>(Blaton, S01) | <i>Salix caprea</i><br>(Flines, S02) | <i>Salix caprea</i><br>(Malassis, S03) |
|                            | $\bar{X} \pm sd$                                | $\bar{X} \pm sd$                            | $\bar{X} \pm sd$                   | $\bar{X} \pm sd$                         | $\bar{X} \pm sd$                     | $\bar{X} \pm sd$                     | $\bar{X} \pm sd$                     | $\bar{X} \pm sd$                       |
| Alanine (Ala)              | 5.11 ± 0.02                                     | 5.09 ± 0.05                                 | 5.00 ± 0.11                        | 5.01 ± 0.05                              | 5.05 ± 0.11                          | 4.94 ± 0.04                          | 5.07 ± 0.04                          | 5.05 ± 0.06                            |
| <b>Arginine (Arg)</b>      | <b>7.43 ± 0.04</b>                              | <b>7.36 ± 0.13</b>                          | <b>7.82 ± 0.15</b>                 | <b>7.60 ± 0.07</b>                       | <b>7.40 ± 0.23</b>                   | <b>7.33 ± 0.03</b>                   | <b>7.67 ± 0.02</b>                   | <b>7.24 ± 0.09</b>                     |
| Ac. aspartique (Asp)       | 10.40 ± 0.15                                    | 10.62 ± 0.09                                | 10.90 ± 0.17                       | 10.45 ± 0.15                             | 11.86 ± 0.47                         | 10.51 ± 0.35                         | 9.91 ± 0.08                          | 10.13 ± 0.19                           |
| Cystéine (Cys)             | 1.37 ± 0.06                                     | 1.29 ± 0.10                                 | 1.45 ± 0.10                        | 1.32 ± 0.08                              | 1.36 ± 0.13                          | 1.29 ± 0.10                          | 1.28 ± 0.10                          | 1.28 ± 0.03                            |
| Ac. Glutamique (Glu)       | 12.19 ± 0.08                                    | 12.45 ± 0.17                                | 12.08 ± 0.16                       | 12.73 ± 0.13                             | 12.30 ± 0.46                         | 13.06 ± 0.32                         | 12.16 ± 0.04                         | 12.13 ± 0.12                           |
| Glycine (Gly)              | 4.47 ± 0.04                                     | 4.32 ± 0.06                                 | 4.30 ± 0.07                        | 4.25 ± 0.04                              | 4.36 ± 0.11                          | 4.29 ± 0.07                          | 4.26 ± 0.03                          | 4.36 ± 0.02                            |
| <b>Histidine (His)</b>     | <b>3.66 ± 0.07</b>                              | <b>3.89 ± 0.02</b>                          | <b>3.73 ± 0.07</b>                 | <b>3.80 ± 0.05</b>                       | <b>3.72 ± 0.11</b>                   | <b>4.03 ± 0.01</b>                   | <b>4.01 ± 0.01</b>                   | <b>3.87 ± 0.04</b>                     |
| <b>Isoleucine (Ile)</b>    | <b>5.04 ± 0.02</b>                              | <b>5.09 ± 0.06</b>                          | <b>5.19 ± 0.12</b>                 | <b>5.01 ± 0.03</b>                       | <b>5.14 ± 0.15</b>                   | <b>5.00 ± 0.00</b>                   | <b>5.13 ± 0.03</b>                   | <b>5.16 ± 0.05</b>                     |
| <b>Leucine (Leu)</b>       | <b>7.88 ± 0.03</b>                              | <b>8.00 ± 0.09</b>                          | <b>7.87 ± 0.10</b>                 | <b>7.88 ± 0.03</b>                       | <b>8.06 ± 0.25</b>                   | <b>7.93 ± 0.12</b>                   | <b>7.93 ± 0.01</b>                   | <b>8.00 ± 0.04</b>                     |
| <b>Lysine (Lys)</b>        | <b>8.36 ± 0.06</b>                              | <b>8.54 ± 0.06</b>                          | <b>8.17 ± 0.10</b>                 | <b>8.33 ± 0.08</b>                       | <b>6.67 ± 2.94</b>                   | <b>8.34 ± 0.05</b>                   | <b>8.34 ± 0.05</b>                   | <b>8.59 ± 0.16</b>                     |
| <b>Méthionine (Met)</b>    | <b>3.14 ± 0.02</b>                              | <b>2.46 ± 1.14</b>                          | <b>2.49 ± 1.27</b>                 | <b>2.63 ± 0.76</b>                       | <b>3.13 ± 0.14</b>                   | <b>2.53 ± 1.10</b>                   | <b>3.26 ± 0.05</b>                   | <b>3.22 ± 0.12</b>                     |
| <b>Phénylalanine (Phe)</b> | <b>5.32 ± 0.06</b>                              | <b>5.30 ± 0.10</b>                          | <b>5.43 ± 0.17</b>                 | <b>5.32 ± 0.08</b>                       | <b>5.21 ± 0.16</b>                   | <b>5.16 ± 0.06</b>                   | <b>5.45 ± 0.02</b>                   | <b>5.36 ± 0.10</b>                     |
| Proline (Pro)              | 4.25 ± 0.10                                     | 4.12 ± 0.03                                 | 4.22 ± 0.22                        | 4.48 ± 0.13                              | 3.96 ± 0.10                          | 4.28 ± 0.10                          | 4.15 ± 0.08                          | 4.14 ± 0.08                            |
| Sérine (Ser)               | 5.83 ± 0.01                                     | 5.77 ± 0.07                                 | 5.66 ± 0.06                        | 5.70 ± 0.06                              | 5.81 ± 0.22                          | 5.66 ± 0.11                          | 5.70 ± 0.02                          | 5.79 ± 0.03                            |
| <b>Thréonine (Thr)</b>     | <b>5.17 ± 0.03</b>                              | <b>5.18 ± 0.06</b>                          | <b>5.19 ± 0.09</b>                 | <b>5.16 ± 0.06</b>                       | <b>5.26 ± 0.18</b>                   | <b>5.09 ± 0.04</b>                   | <b>5.21 ± 0.03</b>                   | <b>5.25 ± 0.03</b>                     |
| Tyrosine (Tyr)             | 4.39 ± 0.04                                     | 4.44 ± 0.16                                 | 4.59 ± 0.14                        | 4.41 ± 0.08                              | 4.46 ± 0.11                          | 4.36 ± 0.03                          | 4.58 ± 0.02                          | 4.45 ± 0.10                            |
| <b>Valine (Val)</b>        | <b>5.98 ± 0.07</b>                              | <b>6.08 ± 0.06</b>                          | <b>5.92 ± 0.07</b>                 | <b>5.94 ± 0.06</b>                       | <b>6.26 ± 0.20</b>                   | <b>6.07 ± 0.17</b>                   | <b>5.88 ± 0.01</b>                   | <b>5.98 ± 0.10</b>                     |
| TOTAL (mg/g en ML)         | 339.40 ± 3.35                                   | 340.05 ± 15.15                              | 354.25 ± 29.40                     | 364.24 ± 21.73                           | 330.22 ± 21.63                       | 351.42 ± 35.60                       | 326.97 ± 4.64                        | 367.32 ± 17.65                         |
| % en AA essentiels         | 51.90 ± 0.65                                    | 51.99 ± 0.01                                | 51.79 ± 0.68                       | 51.67 ± 0.50                             | 50.84 ± 1.60                         | 51.61 ± 0.68                         | 52.89 ± 0.08                         | 52.66 ± 0.12                           |



**Figure 34 :** Chromatogramme (à 570 nm) d'un échantillon de *Salix viminalis* récolté sur la station Tailles (S06)

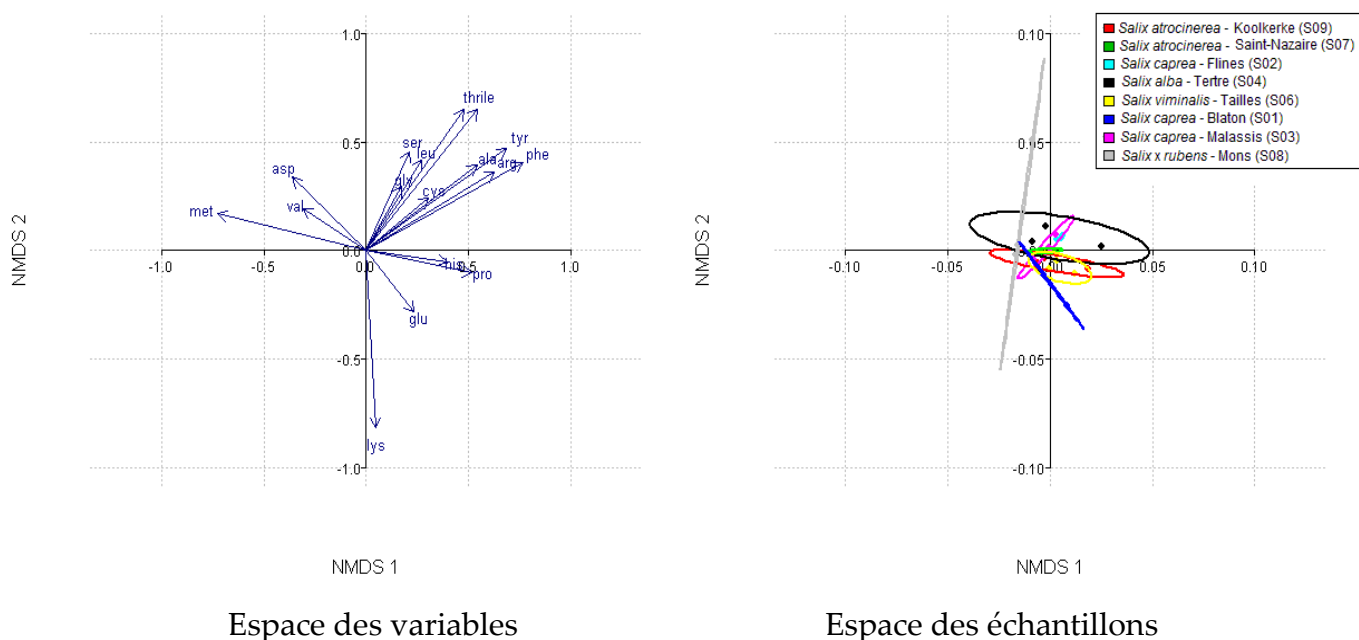


**Figure 35 :** Chromatogramme (à 440 nm) d'un échantillon de *Salix viminalis* récolté sur la station Tailles (S06). Ce chromatogramme permet de quantifier l'acide aminé proline qui est identifié à une longueur d'onde de 410 nm.

Les compositions en acides aminés étant relativement similaires, l'espace des individus a dû être agrandi afin de pouvoir distinguer aisément les différentes espèces florales (différence d'échelle). A cette échelle, on peut constater que les lots de pollen se distribuent légèrement le long de l'axe NMDS 2 (*stress value* = 0.1705 ; Fig. 36).

Bien que la séparation soit très faible sur le graphe d'ordination et qu'aucun composé indicateur ne soit révélé, la perMANOVA détecte une différence significative entre les différents échantillons de pollen de saule ( $F = 2.3584$ ,  $p = 0.000999$  \*\*\*).

Les ellipses associées aux différentes espèces de saule semblent très étalées et cet étalement pourrait *a priori* mettre en exergue une variabilité intra mesure assez conséquente. Toutefois, si on considère l'échelle, cette variabilité reste comparable à celle observée dans les ordinations précédentes.



**Figure 36 :** Ordination nMDS du pollen floral répartis selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). A gauche, l'espace des variables et à droite, l'espace des échantillons. Chaque vecteur représente une variable qualitative (en l'occurrence, un acide aminé) tandis que chaque point représente un échantillon. Les distances reflètent la dissimilarité entre les échantillons, plus la distance entre les points est importante, plus la composition en acides aminés entre les deux échantillons diffère. Pour les codes relatifs aux stations, voir en Annexe 1.

## 4. Discussion

### 4.1. L'oligolectisme d'*Andrena vaga*

L'analyse microscopique des charges scopales ne révèle aucune différence au niveau de la ressource alimentaire utilisée par *Andrena vaga* en fonction de sa localisation. Le pollen scopal provenant des cinq stations de récolte, ainsi que celui provenant des collections, est exclusivement composé de grains de pollen de *Salix* sp.

Le pollen scopal d'un individu, récolté sur la station Aristi en Grèce (S05), comportait 5,51% de pollen de *Prunus* sp. Cependant, il est habituellement considéré qu'une espèce est oligolectique lorsque son pollen scopal est composé à 95% de la même ressource floral, les 5% restant pouvant être une contamination (Müller & Kuhlmann, 2008). Concernant cet individu, les 5.51% de *Prunus* sp., bien que légèrement supérieur au 5%, peuvent être considéré comme une contamination et non comme une différence dans le comportement de récolte de l'abeille.

L'oligolectisme d'*Andrena vaga* est également confirmé au niveau temporel. En effet, les charges scopales de femelles récoltées il y a quelques décennies (1957 pour l'échantillon le plus ancien) sont exclusivement composées de saule. Des résultats identiques ont également été obtenus durant plusieurs années sur le même site de Blaton.

*Andrena vaga* est oligolectique sur *Salix* sp., ce qui confirme l'hypothèse mentionnée par Bischoff (2003) et Vanderplanck *et al.* (2009) dont l'étude était limitée dans l'espace et dans le temps. Cependant, l'analyse microscopique ne permet pas de déterminer précisément quelle espèce de saule compose les charges scopales car la morphologie des grains de pollen au sein de ce genre est très stable.

## 4.2. Qualité nutritionnelle

Les contenus stérolique et protéique du pollen du saule, ainsi que le contenu en acides aminés, ont été déterminés afin de mettre en évidence une éventuelle variation de la composition chimique du pollen, aussi bien au niveau inter- que intraspécifique, au sein du genre *Salix*.

### 4.2.1. Variabilité interspécifique

D'un point de vue qualitatif, les profils stéroliques sont similaires entre les différentes espèces de saule. Dans chaque échantillon, l'érythrodiol, le  $\beta$ -sitostérol et le  $\Delta^5$ -avénastérol, sont retrouvés comme étant les stérols majeurs du pollen, ce qui confirme Vanderplanck (2009). Au niveau quantitatif, de légères différences significatives sont observables entre les différents échantillons. Ces différences ne sont pas de type absence/présence de composé, mais plutôt une variation relative de la proportion de certains stérols. Par exemple, le niveau des stérols majeurs et de la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol sont variables. La teneur en stérols totaux varie également entre les différentes espèces de saule. Ce travail est le premier à mettre en évidence la stabilité de la composition stérolique au sein d'un genre.

L'analyse du contenu protéique des différents échantillons de *Salix* ont permis de démontrer que la concentration en protéines est très variable au sein ce genre. Ceci contredit l'hypothèse de Roulston *et al.* (2000), stipulant que la variabilité des concentrations protéiques au sein d'un même genre de plante est faible. Certaines espèces, comme *Salix x rubens*, renferment une teneur en protéines brutes élevée (20.47%). Au contraire, le contenu en protéines brutes peut chuter jusqu'à 3.17% chez *Salix atrocinerea*.

Les différentes espèces analysées, appartenant au même genre *Salix*, présentent des compositions en acides aminés identiques d'un point de vue qualitatif. Seules de légères différences au niveau quantitatif sont à noter. Le profil en acides aminés au sein du genre *Salix* est donc fortement conservé.

Weiner *et al.* (2010) ont analysé la composition en acides aminés de 142 espèces de plantes différentes dont 91 d'entre elles étant visitées par des abeilles oligolectiques. La comparaison des compositions en acides aminés du pollen de ces différentes plantes montre que les espèces étroitement apparentées diffèrent

seulement légèrement dans leurs proportions en acides aminés, suggérant que les profils sont un trait hautement conservé (Szcześna, 2006 ; Weiner *et al.*, 2010). Les résultats obtenus dans ce travail sont donc en accord avec les résultats de l'étude de Weiner *et al.* (2010).

#### 4.2.2. Variabilité intraspécifique

La comparaison des profils stéroliques des échantillons d'une même espèce (*Salix caprea*), mais provenant de localités différentes, indique également des variations. Ainsi, *Salix caprea* provenant de Blaton comporte un pourcentage en  $\beta$ -sitostérol et en  $\Delta^5$ -avénastérol plus élevé et un pourcentage en érythrodiol plus faible comparé aux échantillons de *Salix caprea* récoltés à Flines et à Malassis. Au contraire, le pollen de Flines et Malassis présente une quantité en érythrodiol plus grande et une quantité en  $\beta$ -sitostérol et en  $\Delta^5$ -avénastérol plus petite par rapport au pollen de Blaton.

Une étude précédente (Vanderplanck, 2009) avait déjà déterminé la composition stérolique du pollen de *Salix caprea* provenant de la station Blaton. Les résultats obtenus concordent au niveau qualitatif mais diffèrent au niveau du pourcentage en certains stérols. L'échantillon analysé lors de ce travail présente une proportion en érythrodiol plus faible, et une proportion en  $\beta$ -sitostérol et en  $\Delta^5$ -avénastérol plus élevée. Des variations quantitatives sont donc aussi observées d'un point de vue temporel.

Il semblerait que lorsque la plante possède un taux en érythrodiol bas, le taux de  $\beta$ -sitostérol et de  $\Delta^5$ -avénastérol soit plus élevé, et inversement. Cependant, bien que la teneur en stérols totaux soit différente entre les différentes espèces de saule, elle paraît stable au sein d'une même espèce, quelle que soit la localisation et l'année de récolte.

La localisation semble donc avoir une influence sur la composition chimique du pollen de saule. Diverses communautés de plantes fournissent une gamme variée de stérols, néanmoins peu de choses sont connues au sujet de la signification fonctionnelle de la variation des profils stéroliques des plantes à l'échelle intraspécifique.

Il est possible que les profils stéroliques des plantes reflètent des adaptations aux conditions locales abiotiques (Behmer & Nes, 2003). Ces facteurs abiotiques peuvent être de plusieurs catégories : édaphiques (structure du sol, teneur en sels minéraux, ...), climatiques (eau, température, lumière, ...), chimiques (concentrations en gaz ou en éléments minéraux) ou topographiques (exposition, pente, altitude, ...).

Par exemple, Xu *et al.* (1988) ont montré que les Chenopodiaceae poussant dans les prairies alcalines et les habitats salins possèdent une haute concentration en  $\Delta^7$ -desmethylsterols (Behmer & Nes, 2003).

Bien qu'une faible différence significative entre les profils en acides aminés des différentes espèces de saule soit révélée, les proportions en acides aminés au sein d'une même espèce semblent stables.

Une variation intraspécifique est également observée au niveau protéique. La concentration en protéines brutes varie en fonction de la localisation de la plante chez *Salix caprea*. Ainsi, elle est de 18.42% pour l'échantillon de Blaton, et de 12.46% et 11.33% respectivement pour Flines et Malassis. Cette constatation est aussi applicable à *Salix atrocinerea*. Les deux échantillons de cette espèce ont un contenu en protéines brutes très différents. Il est de 7.07% pour *Salix atrocinerea* provenant de la côte française (Saint-Nazaire) et de 3.17% pour celui récolté près de la côte belge (Koolkerke).

Le contenu protéique est donc également influencé par la localité. Les variations sont de plus grande ampleur que celles observées dans le cas de la composition en stérols ou en acides aminés. Un pourcentage élevé en protéines pourrait également être dû aux conditions abiotiques locales, comme par exemple une forte eutrophisation du sol.

Moroń *et al.* (2012) ont démontré que des sols pollués en métaux lourds induisaient une composition chimique différente du pollen. Dans cette étude, l'analyse des charges scopales d'*Osmia rufa* montrent que le pollen des plantes provenant de ces sites pollués comporte une proportion en métaux lourds supérieurs à celui des sites non pollués. Si la présence de métaux lourds dans le sol se répercute sur la composition du pollen, la même déduction pourrait être faite, par exemple, pour les éléments minéraux.

La valeur plus élevée en protéines de *Salix caprea* Blaton, comparée aux valeurs de *Salix caprea* Flines et Malassis, pourrait être due à une eutrophisation plus importante du sol. En effet, la Grande Bruyère de Blaton a servi de décharge publique durant plusieurs années. De même, les deux échantillons de *Salix caprea* provenant de Flines et de Malassis présentent une composition chimique très semblable. Les conditions abiotiques de ces deux stations sont donc peut-être similaires.

### 4.3. Spécialisation alimentaire et interaction

*Andrena vaga*, espèce solitaire psammophile, a toujours été décrite comme oligolectique stricte sur le genre *Salix* (Bischoff *et al.*, 2003 ; Vanderplanck *et al.*, 2009). Cependant, le genre *Salix* comprend de 300 à 550 espèces. L'oligolectisme d'*Andrena vaga* n'a jamais été testé sur chaque espèce individuellement.

Les valeurs en stérols et en acides aminés étant stables, ces composés ne devraient pas influencer l'interaction entre *Andrena vaga* et le genre *Salix*. En effet, la composition tissulaire en stérols des femelles est fixe selon la localité. Les femelles trouvent toujours un taux suffisant en stérols et les faibles variations en stérols au sein des différentes espèces de saule ne semblent pas affecter leur métabolisme stérolique.

Au contraire, le contenu protéique semble jouer un rôle prépondérant au niveau de cette interaction. Par exemple, *Salix atrocinerea*, espèce apparemment non visitée par *Andrena vaga*, présente un profil stérolique et en acides aminés similaire aux autres espèces de saule. L'explication de l'absence d'interaction entre *Andrena vaga* et *Salix atrocinerea* pourrait venir du très faible taux en protéines brutes.

Pour que l'interaction entre *Andrena vaga* et les espèces de saule soit stable, ces dernières doivent donc présenter un taux en protéines répondant aux exigences de l'abeille.

Roulston & Cane (2002) ont démontré que les abeilles ne se nourrissent pas de quantités égales en pollens selon la concentration en protéines. En effet, la concentration du pollen en protéines peut influencer la fréquence des voyages de collecte que l'abeille doit effectuer pour fournir à sa progéniture du pollen suffisant pour répondre à leurs besoins alimentaires en protéines (Roulston & Cane, 2002). En

utilisant un pollen pauvre en protéines comme celui de *Salix atrocinerea*, *Andrena vaga* devrait effectuer plus de voyage pour approvisionner une cellule larvaire, ce qui ne serait pas avantageux pour l'espèce. De plus, l'andrène vague a besoin de plus de trois jours actifs de récolte pour approvisionner une cellule larvaire. Elle est considérée comme étant une espèce avec un taux de reproduction bas (Rezkova *et al.*, 2011). L'utilisation d'un pollen de basse qualité en protéines allongerait encore plus le temps qu'il lui faut pour approvisionner une cellule.

Aucune preuve n'a démontré que les espèces d'abeilles généralistes collectent préférentiellement du pollen riche en protéines (Roulston & Cane, 2000). Au contraire, *Andrena vaga*, espèce spécialiste, visiterait peut-être préférentiellement les espèces de saule possédant un taux en protéines élevé. Il serait donc judicieux de vérifier si *Andrena vaga* est capable d'utiliser ou non le pollen de *Salix atrocinerea* pour élever ses larves. Par ailleurs, Dötterl *et al.* (2005) ont démontré qu'*Andrena vaga* est capable de détecter cette espèce de saule. Le parfum floral de *Salix atrocinerea* est similaire à celui de *Salix caprea*. La non-utilisation du pollen de *Salix atrocinerea* n'est donc pas due à un problème de reconnaissance. Si l'andrène vague ne se développe pas à partir d'une alimentation pauvre en protéines, l'absence de cette espèce sur la station Saint-Nazaire, où *Salix atrocinerea* domine, peut être expliquée par une contrainte diététique.

Par ailleurs, *Andrena vaga* ne semble pas modifier ses ressources polliniques. En effet, les profils stéroliques du pollen floral et scopal sont similaires, confirmant Barbier (1970). Au niveau protéique, le pollen scopal présente un pourcentage en protéines plus faible que le pollen floral provenant de la même station.

Néanmoins, une différence significative est observée entre les pollens scopaux provenant des différentes localités. Cette différence pourrait être d'ordre variétal.

Selon Weiner *et al.* (2010), les plantes abritant des abeilles oligolectiques contiennent une concentration en acides aminés essentiels inférieure et dévient fortement de la composition idéale en acides aminés essentiels déterminée pour l'abeille domestique. Les résultats obtenus dans ce travail concordent avec cette hypothèse. Tous les acides aminés essentiels à l'abeille se retrouvent dans le pollen des différentes espèces de saules. Cependant, les pourcentages en acides aminés essentiels sont inférieurs aux valeurs définies par de Groot (1953). Les profils en acides aminés étant similaires entre les différents échantillons analysés, la composition en acides aminés du pollen de saule peut être approximativement définie comme contenant une proportion de 7% en arginine, 4% en histidine, 5% en

isoleucine, 8% en leucine, 8% en lysine, 3% en méthionine, 5% en phénylalanine, 5% en thréonine et 6% en valine.

*Andrena vaga* serait donc capable de se développer à partir d'une ressource alimentaire contenant des proportions en acides aminés essentiels plus faibles. Cette hypothèse confirmerait Weiner *et al.* (2010), stipulant que les abeilles oligolectiques soient mieux adaptées à une qualité nutritive plus faible de leur plante hôte.

#### 4.4. Conservation

Pour conserver les populations d'abeilles, la connaissance de leurs exigences alimentaires est primordiale (Müller *et al.*, 2006). L'expansion d'une espèce de saule présentant un taux en protéines pauvre, et donc de qualité nutritionnelle inférieure, pourrait jouer un rôle sur la conservation d'*Andrena vaga*. *Salix atrocinerea* est l'espèce majoritairement présente dans le sud-ouest de la France. L'expansion de cette espèce pourrait ralentir la croissance d'*Andrena vaga*. En effet, Gusenleitner & Schwarz (2002) avaient répertorié *Andrena vaga* dans la région. Elle y est désormais absente (Mahé, comm. pers.).

De plus, au cours de ces dernières années, l'habitat naturel d'*Andrena vaga* a souvent été dégradé par les canalisations des rivières, le drainage des terrains humides et la culture de prairies sèches ce qui a provoqué la diminution de la disponibilité en saule et en lieu de nidification (Exeler *et al.*, 2008).

Comme mentionné par Mayer *et al.* (2011), la conservation des plantes et la conservation des pollinisateurs est fortement associée. Bien que la préservation du biotope soit essentielle, l'impact de la conservation des pollinisateurs sur la conservation des plantes, et vice versa, doit être mis en évidence.

## 5. Conclusion

Les analyses palynologiques ont confirmé l'oligolectisme d'*Andrena vaga*. Grâce aux différentes méthodes d'analyses utilisées, une variation de la composition chimique du pollen tant au niveau interspécifique qu'intraspécifique a été démontrée.

Cette variation est essentiellement due au contenu protéique. En effet, celui-ci est très variable entre les différentes espèces de saule analysées mais également au sein d'une même espèce, provenant de localités différentes. Une espèce, *Salix atrocinerea*, présente un taux en protéines particulièrement plus bas comparé aux autres espèces analysées.

Au contraire, les profils stéroliques et les profils en acides aminés au sein du genre *Salix* semblent être fortement conservés du point de vue qualitatif. Au niveau quantitatif, des variations significatives de la proportion de certains composés sont observées. Cependant, les variations stéroliques du pollen floral paraissent n'avoir aucun impact sur le métabolisme des femelles d'andrènes car leurs compositions tissulaires sont stables. L'interaction entre *Andrena vaga* et les espèces de saule qu'elle visite s'avère être stable.

Néanmoins, *Andrena vaga* semble être absente des régions où *Salix atrocinerea* est le saule dominant. A première vue, l'andrène vague serait limitée par l'utilisation de pollen riche en protéines pour se nourrir ainsi que pour nourrir sa progéniture, ce qui confirmerait l'hypothèse d'une contrainte physiologique chez les abeilles spécialistes.

## 6. Perspectives

Dans un premier temps, un volet éthologique devrait être ajouté à cette étude afin d'observer le comportement de butinage d'*Andrena vaga* sur différentes régions. Ces observations sur le terrain permettraient de définir quelles espèces de saule sont effectivement visitées par l'andréne. Elles permettraient aussi de confirmer ou infirmer le fait qu'*Andrena vaga* ne collecte pas le pollen de *Salix atrocinerea*.

Dans un deuxième temps, cette étude devrait être couplée avec une étude physico-chimique du sol afin de déterminer si les conditions abiotiques locales ont un effet sur la composition chimique du pollen.

Il serait aussi intéressant d'élargir le champ de ces analyses à toutes les espèces de saule qui se retrouvent sur la distribution d'*Andrena vaga*. Cela permettrait de déterminer si d'autres espèces de saules présentent également un contenu protéique plus faible, comme *Salix atrocinerea*. Il serait également intéressant d'analyser plus d'échantillons de *Salix atrocinerea*, provenant de localités différentes, afin de confirmer que cette espèce présente un taux en protéines plus bas quelle que soit la localisation.

Le meilleur moyen de vérifier si *Andrena vaga* est incapable de se développer à partir d'une alimentation pauvre en protéines serait d'établir une méthode pour tester différentes ressources alimentaires. Dans le cas des bourdons et abeilles mellifères, ceci est assez facile à mettre en œuvre. Il suffit de nourrir des micro-colonies avec une ressource alimentaire particulière ou de placer une ruche sous serre contenant cette ressource. De par le mode de nidification d'*Andrena vaga*, mettre en place de telles méthodes est difficile. Une solution pourrait être de disposer une serre au-dessus de lieux de nidification préexistants. Une espèce de saule définie, par exemple *Salix atrocinerea*, serait placée dans la serre. La suite consisterait à observer si, premièrement, les abeilles survivent et, deuxièmement, si les imagos se développent et émergent l'année suivante.

## 7. Bibliographie

- Adler L. S. 2000.** The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91 (3) : 409 – 420.
- Akihisa T., Kokke W.C.M.C., Tamura T. 1991.** Naturally occurring sterols and related compounds from plants, dans: *Physiology and Biochemistry of Sterols*, éditions Patterson G. W. and Nes W. D., pp. 172–228.
- Alm J., Ohnmeiss T. E., Lanza J., Vriesenga L. 1990.** Preference of cabbage white butterflies and honey bees for nectar that contains amino acids. *Oecologia* 84 : 53 – 57.
- Barbier M. 1970.** Chemistry and biochemistry of pollens. *Progress in Phytochemistry* 2 : 1-34.
- Behmer S.T., Nes W.D. 2003.** Insect Sterol Nutrition and Physiology: A Global Overview. *Advances in insect Physiology* 31: 1-72.
- Bellmann H. 1999.** *Guide des abeilles, bourdons, guêpes et fourmis d'Europe. L'identification, le comportement, l'habitat.* Delachaux et Niestlé, Paris, 336 p.
- Bischoff I., Feltgen K., Breckner D., 2003.** Foraging strategy and pollen preferences of *Andrena vaga* (Panzer) and *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera : Apidae). *Journal of Hymenoptera Research*, 12 (2) : 220-237.
- Brothers D.J., Carpenter J.M. 1993.** Phylogeny of Aculeata: Chrysidoidea and Vespoidea. *Journal of Hymenoptera Research* 2: 227-301.
- Buchmann S.L. 1983.** Buzz pollination in angiosperms, dans: Jones C.E. & Little R.J. (Eds.) 1983. *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 73-113.
- 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.
- Buchmann S.L., Nabhan G.P. 1996.** *The forgotten pollinators*. Island Press, Shearwater books, Washington D. C., 292 p.
- Cane J.H., Sipes S.D. 2006.** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and revised lexicon for oligolecty, dans: Waser N.M. & Ollerton J. 2006. *Plant-pollinator interactions from specialization to generalization*. The University of Chicago

Press, Chicago, pp. 99-122.

- Carreaux, G. 2011.** *Influence de la maturation des ovarioles sur les profils stéroliques d'Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Apoidea, Andrenidae). Mémoire de master, Université de Mons, Mons, 86 p.
- Chen J-H, Sun H., Wen J., Yang Y-P. 2010.** Molecular phylogeny of *Salix* L. (Salicaceae) inferred from three chloroplast datasets and its systematic implications. *Taxon* 59 (1) : 29-37.
- Cook S. M., Awmack C. S., Murray D. A., Williams I. H. 2003.** Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecological Entomology* 28 : 622-627
- Danforth B.N., Sipes S.D., Fang J., Brady S.G. 2006.** The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the national Academy of Science of the United States of America* 103: 15118-15123.
- Day S., Beyer R., Mercer A., Ogden S. 1990.** The nutrient composition of honeybee-collected pollen in Otago New Zealand. *Journal of Apicultural Research* 29 (3) : 138-146.
- Debaille, F., 1995.** - *Partage des ressources polliniques entre abeilles domestiques (Apis mellifera L.) et bourdons (Bombus terrestris (L.)) en fonction de la présence ou de l'absence de  $\beta$ -sitostérol: mise au point d'une méthode expérimentale.* Mémoire de fin d'études UMH Faculté des Sciences, 68 + XVIII pp.
- De Groot A. P. 1953.** Protein and amino acid requirements of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Physiologia Comparata et Oecologia* 3 : 197 – 285.
- Dötterl S., Füssel U., Jürgens A., Aas G., 2005.** 1,4-Dimethoxybenzene, a floral scent compound in willows that attracts an oligolectic bee. *Journal of Chemical Ecology*, 31 (12).
- Dreyer E. & Dreyer W. 1998.** *Guide de la forêt : le milieu, la flore et la faune.* Delachaux et Niestlé, Paris, 384p.
- Duffield G.E., Gibson R.C., Gilhooly P.M., Hesse A.J., Inley C.R., Gilbert F.S., Barnard C.J. 1993.** Choice of flowers by foraging honey bees (*Apis mellifera*): possible morphological cues. *Ecological entomology* 18 : 191-197.
- Graikou K., Kapeta S., Aligiannis N., Sotiroudis G., Chondrogianni N., Gonos E., Chinou I. 2011.** Chemical analysis of Greek pollen – Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chemistry Central Journal* 5 (1) : 33.

- Guirguis G.N., Brindley W.A. 1974.** Insecticide susceptibility and response to selected pollens of larval leafcutting bees, *Megachile pacifica* (Panzer) (Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology* 3: 691-694.
- Gusenleitner F., Schwarz M. 2002.** Weltweite checkliste der Bienengattung *Andrena* mit Bemerkungen und Ergänzungen zu paläarktischen Arten (Hymenoptera, Apidae, Andreninae, *Andrena*). *Entomofauna* 12 : 1 - 1280.
- Harder L.D., Barrett S.C.H. 1993.** Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: Effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* 74 : 1059-1072.
- Herbert Jr.E.W., Svoboda J.A., Thompson M.J., Shimanuki H. 1980.** Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet: effects on brood rearing. *Journal of Insect Physiology* 26: 287-289.
- Hügel M-F, 1965.** Sur les stéroïdes du pollen. *Apidologie*, 8: 309-315.
- Jacquemart A.-L., Angenot A., De Sloover JR, Iserentant I. 2008.** La réserve naturelle domaniale du plateau des Tailles et ses milieux tourbeux. *Approches géographique, historique et biologique*. Glain et Salm, 62, 130p.
- Juan E. M., Wenzel U., Daniel H., Planas J. M. 2008.** Erythrodiol, a natural triterpenoid from olives, has antiproliferative and apoptotic activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 52 (5) : 595 – 599.
- Jürgens A., Dötterl S. 2004.** Chemical composition of anthers volatiles in Ranunculaceae : genera-specific profiles in *Anemone*, *Aquilegia*, *Caltha*, *Pulsatilla*, *Ranunculus*, and *Trollius* species. *American Journal of Botany* 91: 1969-1980.
- Kleijn D., Raemakers I. 2008.** A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89 : 1811 – 1823.
- Kritchevsky D. 1963.** Sterols, dans: *Comprehensive Biochemistry, volume 10, sterols, Bile acids and Steroids*. Editions M. Florkin & E.H. Stotz, Elsevier publishing company.
- Larkin L.L., Neff J.L., Simpson B.B. 2008.** The evolution of a pollen diet: host choice and diet breadth of *Andrena* bees (Hymenoptera: Andrenidae). *Apidologie* 39: 133-145.
- Larsen T. H., Williams N. M., Kremen C. 2005.** Extinction order and altered community structure rapidly disrupt ecosystem functioning. *Ecology Letters* 8 (5) : 538 – 547.
- Levin M.D., Haydak M.H. 1957.** Comparative value of different pollens in the nutrition of *Osmia lignaria* Say (Hymenoptera: Apoidea). *Bee World* 38: 221-226

- Lognay G., Dreze P., Wagstaffe P.J, Marlier M., Severin M. 1989.** Validation of a quantitative procedure for the extraction of sterols from edible oils using radiolabelled compounds. *The Analyst* 114: 1287-1291.
- Lognay G., Boenke A., Wagstaffe P.J, Severin M. 1992.** Edible fats and oils reference materials for sterol analysis with particular attention to cholesterol. Part I. Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. *The Analyst* 117 (7): 1093-1097.
- Nyman T., Julkunen-Tiitto R. 2005.** Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry* 66 : 2836-2843.
- Marcolino De Assis Junior E., Dos Santos Fernandes I. M., Sergio Santos C., De Mesquita L. X., Pereira R. A., Maracaja P. B., Soto-Blanco B. 2011.** Toxicity of castor bean (*Ricinus communis*) pollen to honeybees. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 141 (1-2) : 221-223.
- Mayer C., Adler L., Scott Armbruster W., Dafni A., Eardley C., Huang S-Q., Kevan P. G., Ollerton J., Packer L., Ssymank A., Stout J. C., Potts S. G., 2011.** Pollination ecology in the 21<sup>st</sup> century : key questions for future research. *Journal of Pollination Ecology*, 3 (2), 8-23.
- Michener C.D. 1954.** Records and description of North American megachilid bees. *Journal of the Kansas Entomological Society* 27 : 65-78.
- Michener C.D. 2007.** *The bees of the world, second edition*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 913 p.
- Michez D., Joris I., Iserbyt S. 2008.** Eco-éthologie des visiteurs de *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae) en Belgique. *Belgian Journal of Entomology* 10 : 35-55.
- Michez D., Patiny S., Rasmont P., Timmermann K., Vereecken N.J. 2008.** Phylogeny and host-plant evolution in Mellitidae s.l. (Hymenoptera : Apoidea). *Apidologie* 39 : 146-162.
- Michez D., Vereecken N.J. 2010.** Les abeilles sauvages, une biodiversité insoupçonnée. *Probio revue*, 33 (2) : 110-113.
- Minckley R.L., Roulston T.H. 2006.** Incidental mutualism and pollen specialization among bees, dans: Waser N.M. & Ollerton J. 2006. *Plant-pollinator interactions from specialization to generalization*. The University of Chicago Press, Chicago, pp. 69-98.

A. PINCZEWSKI – Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae) – 2012

- Moore P. D., Webb J. A. and Collinson M. E., 1978.** Pollen analysis. Second edition, *Blackwell scientific publications*, 1991 pp. viii + 216 pp.
- Moroń D., Grześ I. M., Skórka P., Szentgyörgyi H., Laskowski R., Potts S. G., Woyciechowski M. 2012.** Abundance and diversity of wild bees along gradients of heavy metal pollution. *Journal of Applied Ecology*, 49 : 118–125.
- Müller A. 1995.** Morphological specializations in Central European bees for the uptake of pollen from flowers with anthers hidden in narrow corolla tubes (Hymenoptera, Apoidea). *Entomologia Generalis* 20: 43-57.
- Müller A., Krebs A., Amiet F. 1997.** Bienen. Mitteleuropäische Gattung, Lebensweise, Beobachtung. Naturbuch Verlag, Augsburg.
- Müller A., Bansac N. 2004.** A specialized pollen-harvesting device in western palaeartic bees of the genus *Megachile* (Hymenoptera, Apoidea, Megachilidae). *Apidologie*. 35 : 329–337.
- Müller A., Diener S., Schnyder S., Stutz K., Sedivy C., Dorn S. 2006.** Quantitative pollen requirements of solitary bees: Implications for bee conservation and the evolution of bee-flower relationships. *Biological Conservation* 130: 604-615.
- Müller A., Kuhlmann M. 2003.** Narrow flowers specialization in two European bee species of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Apoidea: Colletidae). *European Journal of Entomology* 100: 631-635.
- Müller A., Kuhlmann M. 2008.** Pollen hosts of western palaeartic bees of the genus *Colletes* (Hymenoptera: Colletidae): the Asteraceae paradox. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 719-733.
- Murray T. E., Kuhlmann M., Potts S. G. 2009.** Conservation ecology of bees : populations, species and communities. *Apidologie* 40 (3) : 211-236.
- Nation J. L. 2002.** *Insect physiology and biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 485 p.
- Nicole M-C., 2002.** Les relations des insectes phytophages avec leurs plantes hôtes. *Antennae* 9 (1).
- Nyman T., Julkunen-Tiitto R. 2005.** Chemical variation within and among six northern willow species. *Phytochemistry* 66 (24) : 2836 – 2843.
- Ollerton J., Winfree R., Tarrant S., 2011.** How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120 (3) : 321 – 326.

A. PINCZEWSKI – Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae) – 2012

**Pasteels J.J., Pasteels J.M. 1979.** Etude au microscope électronique à balayage des scopas collectrices de pollen chez les Andrenidae (Hymenoptera: Apoidea: Andrenidae). *Archives de Biologie* 90: 113-130.

**Patiny, S., P. Rasmont, D. Michez, 2009.** A survey and review of the status of wild bees in the West-Palaearctic region. *Apidologie*. 40 : 313-331.

**Pouvreau A. 2004.** *Les insectes pollinisateurs*. Delachaux et Niestlé, Paris, 192p.

**Praz C.J., Müller A., Dorn S. 2008.** Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen? *Ecology* 89: 795-804.

**Rasmont P., Regali A., Ings T. C., Lognay G., Baudart E., Marelier 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.

**Rezkova K., Žáková M., Žáková Z., Straka J. 2011.** Analysis of Nesting Behavior Based on Daily Observation of *Andrena vaga* (Hymenoptera: Andrenidae) *Journal of Insect Behavior* 25 (1) : 24 – 47.

**Robertson C. 1925.** Heterotrophic bees. *Ecology* 6: 412-436.

**Roulston T.H., Cane J.H. 2000.** Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222 : 187-209.

**Roulston, T. H., Cane. J. H. 2002.** The effect of pollen protein concentration on body size in the sweat bee *Lasioglossum zephyrum* (Hymenoptera: Apiformes). *Evolutionary Ecology* 16 : 49-65.

**Roulston T.H., Cane J.H., Buchmann S.L., 2000.** What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen pistil interactions, or phylogeny? *Ecological Monographs* 70 (4) : 617 – 643.

**Sánchez Casas J., Osorio Bueno E., Montaña García A. M., Martínez Cano M. 2004.** Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food chemistry* 87 : 225 – 230.

**Schlindwein C., Wittmann D., Martins C.F., Hamm A., Siqueira J.A., Schiffer D., Machado I.C. 2005.** Pollination of *Campanula rapunculus* L. (Campanulaceae): how much pollen flows into pollination and intro reproduction of oligolectic pollinators? *Plant Systematics and Evolution* 250: 147-156.

**Sedivy C., Praz C.J., Müller A., Widmer A., Dorn S. 2008.** Patterns of host-plant choice in

bees of the genus *Chelostoma* : the constraint hypothesis of host-range evolution in bees. *Evolution* 62 (10) : 2487-2507.

**Sedivy C., Müller A., Dorn S., 2011.** Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology* 25 (3) : 718 – 725.

**Solberg Y., Remedios G. 1980.** Chemical composition of pure and bee-collected pollen. *Meldinger fra Norges landbrukshogskole* 59(18) : 1 – 13.

**Standifer L.N., McCaughey W.F., Dixon S.E., Gilliam M. & Loper G.M. 1980.** Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. II. Protein, Amino acids and enzymes. *Apidologie* 11 : 163-171.

**Standley R.G., Linskens H.F. 1974.** Organic Acids, Lipids and Sterols, chapitre 10, dans: *Pollen Biology Biochemistry Management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

**Strickler K. 1979.** Specialization and foraging efficiency of solitary bees. *Ecology* 60: 998-1009.

**Strong D.R., Lawton J.H., Southwood T.R.E. 1984.** *Insects on Plants: Community Patterns and Mechanisms*, Cambridge, MA: Harvard University Press, pp. 313.

**Svoboda J.A., Thompson M.J., Herbert Jr.E.W., Shimanuki H. 1980.** Sterol utilization in honey bees fed a synthetic diet: analysis of prepupal sterols. *Journal of Insect physiology* 26: 291-294.

**Svoboda J.A., Herbert Jr. E.W., 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., Günter G.F., Feldlaufer M.F. 1991.** Recent Advances in Insect Steroids Biochemistry, dans: Patterson G.W., Nes W.D., *Physiology and Biochemistry of sterols*. American Oil Chemists'Society, Champaign, pp. 293-323.

**Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website.** Inventaires des Sites de Grandes Interêt Biologique.

<http://biodiversite.wallonie.be/cgi/sibw.sgib.form.pl?SGIBCODE=676#>

**Système d'Informations sur la Biodiversité en Wallonie, website.** Programme LIFE Nature, Restauration des habitats naturels sur le Plateau des Tailles.

<http://old.biodiversite.wallonie.be/offh/LIFEPLTTAILLES/PLT2.htm>

**Szczêsna T. 2006.** Protein content and amino acid composition of bee-collected pollen from

selected botanical origins. *Journal of Apicultural Science* 50 (2) : 81 – 90.

- Tasei J.-N., Aupinel P. 2008.** Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixed tested on larvae produced by bumblebee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39 : 397-409.
- Thorp R.W. 1969.** Systematics and ecology of bees of subgenus *Diandrena* (Hymenoptera : Andrenidae). *Univ. California Publ. Entomol.* 52 : 1-146.
- Thorp R.W. 1979.** Structural, behavioural, and physiological adaptations of bees (Apoidea) for collecting pollen. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66: 788-812.
- Thorp R.W. 2000.** The collection of pollen by bees. *Plant Systematics and Evolution* 222: 211-223.
- Vanderplanck M., 2009.** *Métabolisme stérolique de deux espèces d'abeilles solitaires spécialistes sur saule*. UMONS, Mémoire de fin d'étude, 152 pp.
- Vanderplanck M., Bruneau E., Michez D. 2009.** Oligolectisme et décalage phénologique entre plante hôte et pollinisateur : étude de deux espèces printanières psammophiles, *Colletes cunicularius* (L.) (Hymenoptera, Colletidae) et *Andrena vaga* (PANZER) (Hymenoptera, Andrenidae). *Osmia* 3: 23-27.
- Vanderplanck M., Michez D., Vancraenenbroeck S. and Lognay G., 2011.** Micro-quantitative method for analysis of sterol levels in honeybees and their pollen loads. *Analytical Letters*, 44: 1-14.
- Vanderplanck M., Leroy B., Wathelet B., Wattiez R., Michez D., 2012.** Standardised protocol to evaluate pollen proteins as bee food source. *Apidologie* (In Press)
- Vereecken N., Michez D., Colomb P., Wollast M., 2010.** Comment connaître et aider nos abeilles sauvages (1/5). *L'Homme et l'Oiseau* (LRBPO) 2010/1 : 35-38
- Vereecken N., Toffin E., Gosselin M., Michez D., 2006.** Observations relatives à la biologie et à la nidification de quelques abeilles sauvages psammophiles d'intérêt en Wallonie ; 1. Observations printanières. *Parcs et Réserves* 61 (1): 8-13.
- Xu, S., Norton, R. A., Crumley, F. G. and Nes, W. D. 1988.** Comparison of the chromatographic properties of sterols, select additional steroids and triterpenoids : Gravity flow liquid chromatography, thin layer chromatography, gas-liquid chromatography and high-performance liquid chromatography. *Journal of*

A. PINCZEWSKI – Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae) – 2012

*Chromatography* 452, 377–389.

**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.

**Waser N.M., Ollerton J., 2006.** *Plant-Pollinator Interactions*. The University of Chicago Press, Chicago, 445 p.

**Weiner C. N., Hilpert A., Werner M., Linsenmair K. E., Blüthgen N., 2010.** Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees. *Apidologie*, 41 : 476-487.

**Westerkamp C. 1996.** Pollen in bee-flower relations. Some considerations on melittophily. *Botanica Acta* 109 : 325-332.

**Westrich P. 1989.** *Die Wildbienen Baden-Württembergs*. Eugen Ulmer, Stuttgart, Germany.

**Williams I. H., Corbet S. A., Osborne J. L. 1991.** Beekeeping, wild bees and pollination in the European Community, *Bee World* 72 : 170 – 180.

**Williams P. H. 1986.** Bumble bees and their decline in Britain. *Central Association of Beekeepers*, UK.

## 8. Annexes

### 8.1. Annexe 1 : liste des stations

**Table 9 :** Table des différentes stations échantillonnées au cours de cette étude pour la récolte de matériel. Dans la colonne localité, B. = Belgique, F59 = France, département du Nord, F91 = France, département de l'Essonne, F44 : France, département de la Loire-Atlantique, G. = Grèce.

| Code | Localité                 | Lieu-dit                                       | Coordonnées                    | Altitude | Date                |
|------|--------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|----------|---------------------|
| S01  | B., Blaton               | La Grande-Bruyère                              | 50°29'32,3''N 03°40'17,2''E    | 46 m     | 5.IV.2011           |
| S02  | F59, Flines-lez-Mortagne | Forêt domaniale de Flines-lez-Mortagne         | 50°31'29,4''N 03°29'20,7''E    | 49 m     | 25 &<br>26.III.2011 |
| S03  | F91, Forges-les-Bains    | Forêt de Malassis                              | 48°37'34,3''N 02°01'03,8''E    | 145 m    | 29.III.2011         |
| S04  | B., Tertre               | Lac des Herbières                              | 50°27'33,62"N<br>03°47'24,39"E | 23 m     | 7.IV.2011           |
| S05  | G., Aristi               | -                                              | 39°56'5,19"N 20°40'17,04"E     | 648 m    | 15.IV.2011          |
| S06  | B., Bihain               | Plateau des Tailles, réserve des Grande Fanges | 50°14'40''N 5°46'45''E         | 557 m    | -                   |
| S07  | F44, Saint-Nazaire       | L'étang du Bois-Joalland, L'Immaculée          | 47°16'46,4''N 02°15'37,8''E    | 10 m     | 9.III.2011          |
| S08  | B., Mons                 | Le Grand Large                                 | 50°28'36.07"N 3°56'58.47"E     | 31 m     | -                   |
| S09  | B., Bruges, Koolkerke    | La forteresse Beieren                          | 51°14'19.47"N 3°15'19.33"E     | 9 m      | 20.IV.2012          |

## 8.2. Annexe 2 : liste des échantillons

**Table 10 :** Table des différents échantillons récoltés au cours de cette étude pour l'espèce envisagée. Dans la colonne origine et date, les codes indiqués entre parenthèses renvoient à la liste des stations en annexe 1. Les cases colorées indiquent les individus ayant été analysés pour le contenu stérannique. Ind. = individu.

| Espèce              | Ind. | Origine et date   | Stade  | Sexe    | Charge pollinique | Récolteurs    |
|---------------------|------|-------------------|--------|---------|-------------------|---------------|
| <i>Andrena vaga</i> | 1.1  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               | Zerck P-L.    |
|                     | 1.2  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.3  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.4  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.5  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.6  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.7  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.8  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.9  | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.10 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.11 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.12 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.13 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.14 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.15 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.16 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.17 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.18 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.19 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 1.20 | Blaton 2011 (S01) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 2.1  | Flines 2011 (S02) | Adulte | Femelle | Oui               | Pinczewski A. |
|                     | 2.2  | Flines 2011 (S02) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 2.3  | Flines 2011 (S02) | Adulte | Femelle | Oui               |               |
|                     | 2.4  | Flines 2011 (S02) | Adulte | Femelle | Oui               |               |

A. PINCZEWSKI – Variabilité de l'interaction entre l'abeille spécialiste *Andrena vaga* (Panzer) (Hymenoptera, Andrenidae) et le genre *Salix* L. (Salicaceae) – 2012

|  |      |                     |        |         |     |                                  |
|--|------|---------------------|--------|---------|-----|----------------------------------|
|  | 2.5  | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 2.6  | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 2.7  | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 2.8  | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 2.9  | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 2.10 | Flines 2011 (S02)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.1  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui | Pinczewski<br>A., Zerck P-<br>L. |
|  | 3.2  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.3  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.4  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.5  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.6  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.7  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.8  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.9  | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.10 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.11 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.12 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.13 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.14 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 3.15 | Malassis 2011 (S03) | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.1  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui | Pinczewski<br>A., Zerck P-<br>L. |
|  | 4.2  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.3  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.4  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.5  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.6  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.7  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.8  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.9  | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.10 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.11 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.12 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.13 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.14 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 4.15 | Tertre 2011 (S04)   | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 5.1  | Grèce 2011 (S05)    | Adulte | Femelle | Oui | Vereecken<br>N.                  |
|  | 5.2  | Grèce 2011 (S05)    | Adulte | Femelle | Oui |                                  |
|  | 5.3  | Grèce 2011 (S05)    | Adulte | Femelle | Oui |                                  |

|  |     |                  |        |         |     |  |
|--|-----|------------------|--------|---------|-----|--|
|  | 5.4 | Grèce 2011 (S05) | Adulte | Femelle | Oui |  |
|  | 5.5 | Grèce 2011 (S05) | Adulte | Femelle | Oui |  |
|  | 5.6 | Grèce 2011 (S05) | Adulte | Femelle | Oui |  |
|  | 5.7 | Grèce 2011 (S05) | Adulte | Femelle | Oui |  |

### 8.3. Annexe 3 : Liste des spécimens de collections

**Table 11 :** Table reprenant les informations relatives aux spécimens de collections analysés. Dans la colonne localité, B. = Belgique, P-B. = Pays-Bas. La colonne 'Oligolectisme' indique que les charges scopales des femelles sont composées de *Salix* sp.

| Collection                                   | Localité                                            | Date                     | Altitude | Nombre de spécimens | Oligolectisme |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------|----------|---------------------|---------------|
| Laboratoire de Zoologie, UMon                | B., Hainaut, Erbisoeul<br>50°30'9"N 3°52'43"E       | 12.V.2006                | 74 m     | 5                   | ✓             |
|                                              | B., Hainaut, Hensies, Terril                        | 8.IV.1988                | 21 m     | 2                   | ✓             |
|                                              | B., Hainaut, Stambruges,<br>Mer de sable            | 28.IV.1996               | 66 m     | 1                   | ✓             |
| Bernard Frin ?                               | F., Hautes-Alpes, Château-<br>Ville-Vieille         | 21.V.2009                | 1520 m   | 3                   | ✓             |
| National Museum of Natural History of Leiden | P-B., Bokhoven                                      | 16.IV.2000               | 5 m      | 1                   | ✓             |
|                                              | B., Limbourg, Lanaye,<br>Ecluse                     | 8.V.1995                 | 49 m     | 2                   | ✓             |
|                                              | P-B., Hooge Heide                                   | 5.V.2000                 | 15 m     | 1                   | ✓             |
|                                              | P-B., Sint-Pietersberg                              | 30.IV.1989<br>10.IV.1990 | 78 m     | 2                   | ✓             |
|                                              | P-B., Bemelen                                       | 29.IV.1998               | 79 m     | 1                   | ✓             |
|                                              | P-B., Maastricht                                    | 25.IV.1987               | 49 m     | 3                   | ✓             |
|                                              | P-B., Veenendaal                                    | 30.IV.1984               | 7 m      | 1                   | ✓             |
|                                              | P-B., Ulvenhout                                     | 21.IV.1957               | 7 m      | 1                   | ✓             |
|                                              | P-B., Ede                                           | 30.IV.1999               | 23 m     | 1                   | ✓             |
|                                              | P-B., Gelderland,<br>Overasselt, Hatertse<br>vennen | 14.IV.1968               | 14 m     | 1                   | ✓             |
|                                              | Uusikirkko                                          | 1970                     | 46 m     | 1                   | ✓             |
|                                              | B., Limbourg, Kanne                                 | 4.V.1986                 | 61 m     | 2                   | ✓             |
|                                              | P-B., Tombe                                         | 4.IV.1965                |          | 1                   | ✓             |