

Table des matières

1.	Introduction	6
1.1.	Les bourdons	6
1.1.1.	Généralités.....	6
1.1.2.	Cycle de vie.....	8
1.1.3.	Le choix des ressources.....	11
1.1.4.	Besoins nutritionnels.....	12
1.1.4.1.	Stérols.....	12
1.1.4.2.	Acides aminés.....	13
1.1.4.3.	Polypeptides	13
1.2.	Le déclin des bourdons	14
1.2.1.	Généralités.....	14
1.2.2.	Les changements de diètes	16
1.3.	Modèles étudiés.....	17
1.3.1.	<i>Bombus terrestris</i>	17
1.3.2.	Plantes modèles	18
1.3.2.1.	<i>Trifolium repens</i> et <i>Trifolium pratense</i>	18
1.3.2.2.	<i>Rubus</i> sp.	21
1.3.2.3.	<i>Calluna vulgaris</i>	22
2.	Objectifs	24
3.	Matériel et Méthodes.....	25
3.1.	Collectes de pollen	25
3.2.	Élevage de micro-colonies	27
3.2.1.	Dispositif expérimental	27
3.2.2.	Conditions d'élevage	28
3.2.3.	Méthodes d'élevage	29
3.2.4.	Paramètres mesurés.....	30
3.2.4.1.	Consommation de pollen et de sirop	30
3.2.4.2.	Masse des larves	30
3.2.4.3.	Efficacité du pollen	31
3.2.4.4.	Analyse d'excréments	31
3.3.	Analyses chimiques	32

3.3.1.	Stérols	32
3.3.2.	Polypeptides	35
3.3.3.	Acides aminés.....	37
3.3.3.1.	Acides aminés totaux	37
3.3.3.2.	Acides aminés libres	37
3.4.	Analyses statistiques	38
3.4.1.	Analyses univariées : boîtes de dispersion (boxplot) et analyse de la variance (ANOVA/Kruskal-Wallis).....	38
3.4.2.	Analyses multivariées : positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) et analyse de la variance multivariée par permutation (perMANOVA).....	38
4.	Résultats	40
4.1.	Élevages	40
4.1.1.	Efficacité des diètes	40
4.1.2.	Digestibilité du pollen.....	41
4.2.	Comparaisons des compositions chimiques des plantes sources.....	42
4.2.1.	Acides aminés.....	42
4.2.1.1.	Acides aminés totaux	42
4.2.1.2.	Aspartate et glutamate.....	43
4.2.1.3.	Proline	44
4.2.1.4.	Acides aminés essentiels	45
4.2.2.	Polypeptides totaux.....	46
4.2.3.	Stérols	47
4.2.3.1.	Analyse des chromatogrammes	47
4.2.3.2.	Stérols totaux	50
4.2.3.3.	Composés stéroliques.....	51
5.	Discussion.....	52
5.1.	Efficacité de la diète en pollen de <i>Rubus</i> sp. pour <i>Bombus terrestris</i>	52
5.2.	Choix floraux des bourdons	54
5.3.	Modifications de la diète de <i>Bombus terrestris</i>	55
6.	Conclusion.....	56
7.	Perspectives	57
8.	Bibliographie	58

1. Introduction

1.1. Les bourdons

1.1.1. Généralités

Les bourdons sont des *Hymenoptera* du sous-ordre des *Apocrita*, de la superfamille des *Apoidea*, de la famille des *Apidae*, du genre *Bombus*. Ils se retrouvent majoritairement dans les régions tempérées d'Europe, d'Asie, et d'Amérique du Nord, mais certaines espèces se retrouvent également au niveau du cercle Arctique (comme le *Bombus polaris*) et le long de la frange nord de l'Afrique. Les seules zones où ils sont absents sont les tropiques, excepté au Brésil et en Australie où quelques espèces ont été introduites (Alford, 1975).

Les bourdons vivent en société organisée en caste (mâles, ouvrières et reine). La reine fondatrice de la colonie se distingue des ouvrières par sa taille supérieure (Chapman, 2012).

Chez les femelles, les pattes postérieures sont modifiées afin de permettre la collecte de pollen. Les tibias sont légèrement aplatis, avec la face extérieure glabre, et les soies de la face interne allongées et recourbées pour former un panier de collecte pour le pollen, le *corbiculum*. Quant à la région tibio-tarsale, elle est modifiée en une sorte de brosse servant à la récolte du pollen (figure 1) (Alford, 1975).

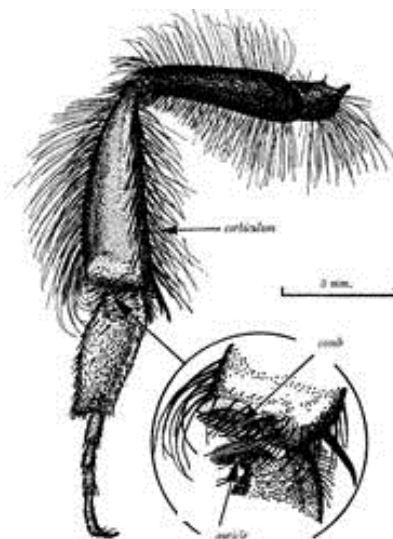


Figure 1: Vue d'une patte postérieure d'un bourdon (Alford, 1975)

La majorité des espèces de bourdons sont généralistes, c'est-à-dire qu'elles sont susceptibles de collecter le pollen sur une grande diversité d'espèces et de familles de plantes. Cependant, au moins trois espèces spécialistes de bourdon ont été dénombrées : *B. consobrinus*, *B.*

gerstaeckeri et *B. brodmannicus* sur respectivement *Aconitum septentrionale*, *Aconitum* spp. et *Cerinth* spp (Goulson, 2010).

Néanmoins, il semblerait que chaque individu de la colonie collecte préférentiellement toujours sur le même type de plante lors d'une séquence de visites florales. Darwin explique ce phénomène par son hypothèse d'interférence. Celle-ci explique que les collectes de pollen chez les insectes s'effectuent plus rapidement lorsqu'il s'agit de répéter la même méthode de collecte (Goulson, 2010).

Goulson & Darvill (2004) ont mesuré une différence de taille dans la gamme des plantes visitées lors des collectes de pollen entre les espèces de bourdons en déclin et les stables. Ils ont remarqué que les espèces les plus abondantes ont le régime alimentaire le plus vaste. Qui plus est, pour toutes les espèces confondues, la diversité florale visitée pour la collecte de pollen est plus faible que celle visitée pour la collecte de nectar. Cette diversité de plantes visitées pour la collecte de nectar n'est, elle, pas corrélée à l'abondance d'une espèce de bourdon.

Ishii (2005) vérifie une autre hypothèse expliquant la fidélisation de chaque individu à une ressource. Les bourdons possèdent une mémoire précoce à court terme, une mémoire terminale à court terme, une mémoire à moyen terme, une mémoire précoce à long terme, et une mémoire terminale à long terme. Les deux premières permettent un enregistrement rapide des informations, mais ont peu de capacité de stockage, et l'information n'est pas retenue longtemps. Les trois dernières peuvent garder plus d'informations et durent plus longtemps. La capacité d'apprentissage rapide des deux mémoires à court terme est l'autre explication découverte de la fidélité d'un bourdon à un type de fleur.

De nombreuses espèces de bourdons sont actuellement en déclin (Williams & Osborne, 2009). Par exemple, pour les 16 espèces qui étaient les plus représentées en Grande-Bretagne, plus de la moitié sont considérées comme rares et en déclin. Parmi ces espèces, se retrouvent : *B. distinguendus* (Morawitz), *B. humilis* (Illiger), *B. muscorum* (Linnaeus), *B. ruderatus* (Fabricius), *B. subterraneus* (Linnaeus), et *B. sylvarum* (Linnaeus). Ce déclin est généralisé dans le monde entier (Goulson, 2003; Edward & Williams, 2004; Benton, 2006), et la Belgique n'est pas épargnée (Rasmont *et al.*, 2005)

Le déclin des bourdons et d'autres pollinisateurs pourrait avoir un impact négatif sur notre économie, notamment par des déficits de nourriture (Potts *et al.*, 2011).

La perte des bourdons impliquerait également de lourdes conséquences sur la biodiversité. En effet, de nombreuses plantes sont pollinisées majoritairement voire uniquement par ceux-ci. Leur disparition entraînerait donc par la suite la disparition de ces plantes. Ces changements-là auront un impact sur les autres animaux herbivores dont ces plantes constituent la principale ressource alimentaire, impact qui se répercuterait tout le long de la chaîne alimentaire (Goulson & Darvill, 2004).

1.1.2. Cycle de vie

Les colonies de bourdons sont annuelles, et seules les reines survivent en hiver. Le début de toute colonie commence par le vol nuptial de la reine fondatrice, vol pendant lequel elle sera fécondée et qui précède l'hibernation. Après avoir été fécondées, les reines cherchent un abri et creusent généralement un terrier (*hibernaculum*) dont l'emplacement est choisi en fonction de divers facteurs, notamment la teneur en humidité. En général, l'hibernation dure de six à huit mois (Alford, 1975; Goulson, 2010).

Les reines de *Bombus terrestris* font partie des premières à sortir d'hibernation en Grande-Bretagne, avec *Bombus jonellus*, *Bombus pratorum* et *Bombus lucorum*. Cette sortie d'hibernation est gouvernée par les températures ambiantes. Pour *Bombus terrestris*, la température minimale requise est généralement atteinte en mi-février. Leur sortie coïncide généralement avec l'éclosion des premières fleurs. Les reines en profitent pour faire des réserves de pollen et de nectar. Le *Salix caprea* et le *Salix atrocinerea* sont des plantes particulièrement appréciées par les reines de par leur grande production de pollen (Heinrich, 1979).

La production d'hormone gonadotrophique débute en hiver, alors que mes corpora allata commencent à s'activer. Les ovaires ne sont pas encore très développés au moment de la sortie d'hibernation. Ils ne commencent à vraiment prendre du volume que lors de la post émergence, alors qu'une activité plus importante est retrouvée. Leurs ovaires ne peuvent réellement bien se développer que s'ils reçoivent un apport suffisant en polypeptides. Leur source principale de polypeptide est le pollen qu'elles consomment en très grande quantité (Heinrich, 1979).

Tant que leurs ovaires ne sont pas encore développés, les jeunes reines passent l'essentiel de leur temps à voler et à se nourrir. Quand leurs ovarioles contiennent des œufs ainsi que des cellules nurses, elles se mettent à chercher un endroit pour nidifier (Heinrich, 1979). En fonction de l'espèce, la reine choisit différents sites de nidification. Les reines s'installent généralement dans un ancien terrier de la taille d'une balle de tennis qu'elle tapisse avec les matériaux qu'elle a à disposition. C'est le cas notamment pour les reines de *Bombus terrestris*. D'autres espèces, peuvent nicher à même le sol (Goulson, 2010).

La reine forme par après une nouvelle logette d'environ 25 à 30 mm dans ce terrier qui est reliée à l'extérieur par un tunnel. Cette logette est composée des meilleurs matériaux dont elle dispose, comme par exemple des poils de mammifères. Ce tunnel doit être suffisamment large pour permettre à la reine d'y faire des allers et retours. Si les matériaux utilisés pour ces constructions est humide, elle se sert de sa chaleur corporelle pour les faire sécher (Goulson, 2010).

C'est dans cette nouvelle cavité qu'elle pond ses œufs sur un pain de couvaison en pollen. Cette première ponte comporte généralement de 8 à 16 œufs. Ce pain servira par la suite de

nourriture à la descendance émergente. Ce pain de pollen est perforé de plusieurs cavités qui recevront chacune une larve. Elle recouvre de plus ses œufs d'une nouvelle couche de pollen, puis, d'une couche d'un mélange de pollen et de cire. La cire utilisée est produite par des glandes à cire, dont une grande partie se situe sur la moitié dorsale de l'abdomen. Elle construit également un pot près de l'entrée qu'elle remplit tous les jours de nectar pour s'alimenter et fournir l'énergie nécessaire à garder sa température de couvaison suffisamment élevée (Alford, 1975; Goulson, 2010) (figure 2).

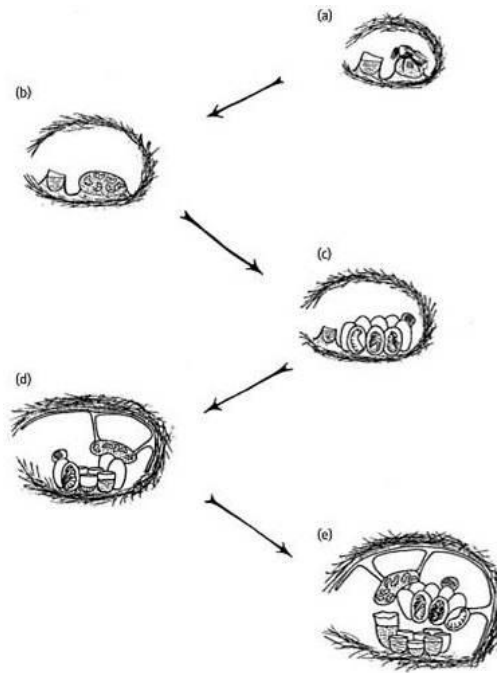


Figure 2 : Développement des premières pontes d'une colonie (Goulson, 2010)

La durée de chaque stade larvaire varie en fonction de la température ambiante, et pourrait aussi varier en fonction de l'espèce. En général, la première ouvrière sort cinq semaines après la ponte, et les autres sortent deux à cinq jours plus tard. En général, les œufs du centre sont ceux qui sont le plus au chaud, et donc, qui finissent leur développement en premier (Alford, 1975; Goulson, 2010).

La phase sociale du cycle de vie d'une colonie de *Bombus terrestris* commence lorsque les premières ouvrières éclosent. À partir de ce moment, les ouvrières de la colonie se chargent d'agrandir la colonie et de nourrir les futures larves (Alford, 1975).

La croissance du nombre d'ouvrières augmente d'abord doucement, puis, de plus en plus vite jusqu'à atteindre un palier. À ce moment, le nombre d'ouvrières n'augmente plus, et la reine se met à pondre des mâles et des nouvelles reines (Heinrich, 1979).

La reine émet des phéromones contraceptives dans la colonie afin d'empêcher les ouvrières de pondre. Lorsqu'une ouvrière pond, la larve est généralement rapidement dévorée. Lorsque la colonie devient trop grande et que l'effet des phéromones ne suffit plus, ou que la reine meurt,

les ouvrières se mettent à pondre plus régulièrement, et une progéniture mâle d'ouvrières peut se développer. Lors de la mort prématurée de la reine, il arrive qu'une ouvrière prenne la tête de la colonie pendant ses derniers jours (Alford, 1975; Goulson 2010).

La production de mâles a lieu un peu avant celle des reines. Ceci est la preuve que la production de mâles n'est pas initiée par l'épuisement des réserves de sperme de la reine. Les larves destinées à donner des reines recevront de plus grandes quantités de nourriture (Alford, 1975; Goulson 2010).

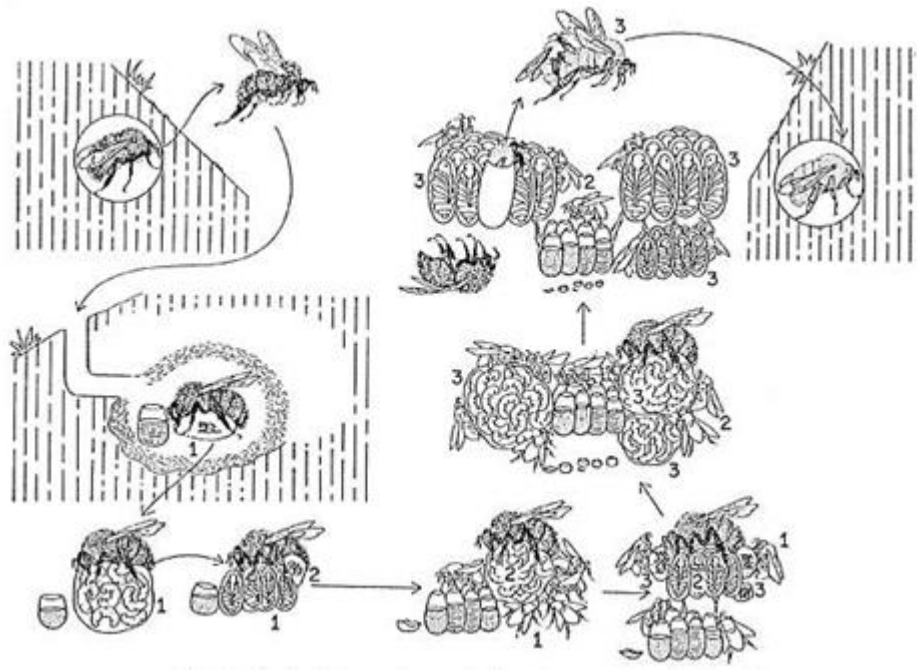


Figure 3: Schéma résumant le cycle de vie de *Bombus terrestris* L. (Heinrich, 1979)

1.1.3. Le choix des ressources

Comme le remarquait déjà Aristote en 340 avant J-C, la majorité des insectes pollinisateurs collectent sur une seule espèce florale au cours d'un même voyage de récolte de pollen. Cette fidélisation à un type floral est plus une adaptation de perfectionnement de récolte qu'une limitation due au système nerveux (Grüter & Ratnieks, 2011).

Il semblerait que les ouvrières de bourdons soient susceptibles de sélectionner le pollen qu'elles récoltent en fonction de ses qualités nutritionnelles, et notamment sa teneur en polypeptides (Tasei & Aupinel, 2008). Cette caractéristique semble intervenir dans le principe de co-évolution plantes - insectes. Cette sélection s'effectue sur base de composés volatiles (de Brito Sanchez, 2011). Ceux-ci sont contenus dans le pollenkitt englobant les grains de pollen entomophiles et qui contiennent, en plus de ces composés volatiles, des acides gras pouvant également servir d'indices pour les pollinisateurs (Nicolson, 2011).

Par ailleurs, les bourdons semblent capables de déterminer la qualité nutritive d'un pollen. Ils peuvent déterminer la quantité d'acides aminés hydrosolubles que contient un pollen, ce qui est un excellent indicateur de la quantité totale d'acides aminés. De cette manière, la qualité des ressources collectées est optimisée grâce à des décisions individuelles (Leonhards & Blüthgen, 2012).

La fidélisation chez les *Bombus terrestris* est également favorisée par la quantité de pollen et de nectar récoltés sur chaque type de fleur, la différence de couleur entre les fleurs, et la distance entre les fleurs. Ainsi, la fidélisation sera plus faible sur des plantes géographiquement plus éloignées et dont la couleur est proche (Grüter and Ratnieks, 2011).

Des observations ont déjà montré que la quantité de pollen consommée par une colonie de bourdons est indépendante de la qualité nutritionnelle du pollen fourni. Par contre, la taille et la masse des larves produites varie en fonction de cette qualité nutritionnelle. (Weiner *et al.*, 2010; Vanderplanck *et al.*, soumis).

Quelles que soient les ressources à disposition, lorsqu'il n'y a pas de risque de pénurie alimentaire pour la colonie, les ouvrières diminuent leur activité de vol, diminuant ainsi les coûts de collecte. Cette observation de Pelletier & McNeil (2004) leur a permis de déduire que les ouvrières sont capables d'estimer le niveau des ressources intranidales afin d'ajuster leurs fréquences de butinage.

Un autre facteur déterminant dans le choix des plantes visitées a été découvert par Stout & Goulson (2002). Il s'agit de la capacité des bourdons de détecter les plantes déjà visitées. Cette reconnaissance se fait via un marquage préalable et leur permet d'augmenter l'efficacité des récoltes en évitant de repasser sur une plante dont le pollen et/ou le nectar ont déjà été collectés.

1.1.4. Besoins nutritionnels

1.1.4.1. Stérols

Les stérols comme les acides gras et les phospholipides, sont des composants principaux des membranes cellulaires. Les bourdons sont incapables de synthétiser des stérols et doivent par conséquent en puiser dans leur alimentation (Chapman, 2012).

Pour de nombreux groupes d'insectes, le cholestérol et le phytostérol sont les précurseurs de l'hormone ecdystéroïde (C_{27}) (figure 4), l'hormone de mue. Cette transformation s'effectue par une désalkylation, c'est à dire le retrait d'un ou deux carbones. Une carence en stérols dans l'alimentation des larves peut donc entraîner un retard voire un empêchement des mues (Chapman, 2012).

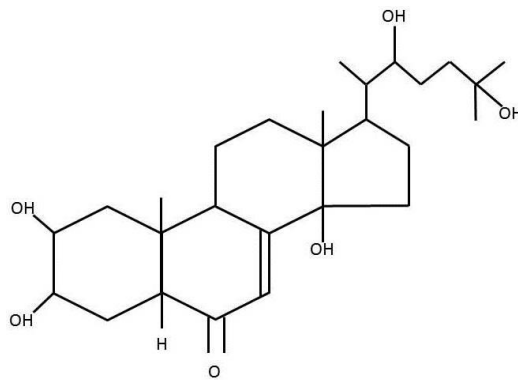


Figure 4: Ecdystéroïde (sources: J. Sturbois sur base de Savchenko & Odinkov (2012))

Les bourdons sont incapables d'effectuer cette désalkylation. Ils utilisent le makistéron A (figure 5) comme hormone de mue (C_{28}) (Debaille, 1995). Le 24-méthylène cholestérol sert de précurseur à cette hormone (Vanderplanck *et al.*, soumis). Enfin, certains dérivés de stérols peuvent servir de phéromones (Chapman, 2012).

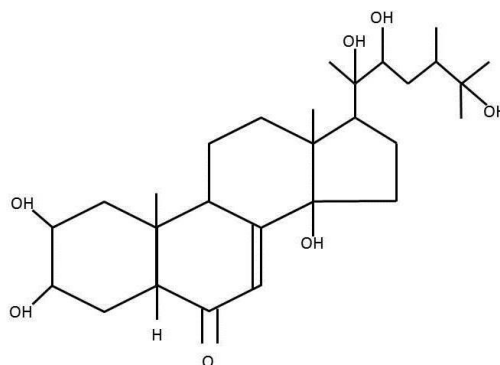


Figure 5: Makistéron A (source: J. Sturbois sur base de Royer *et al.* (1995))

1.1.4.2. Acides aminés

Chez les insectes, les acides aminés peuvent se retrouver sous forme libre ou agencés en polypeptides (Chapman, 2012).

Les bourdons sont incapables de synthétiser 9 acides aminés : thréonine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, histidine, lysine, arginine, phénylalanine. Leur principale source provient de la dégradation des polypeptides. Ceux-ci ayant un ratio d'acides aminés essentiels et non essentiels proche de 1 : 1. Une carence en ces acides aminés essentiels peut entraîner un défaut de croissance pour l'insecte (Chapman, 2012).

Les acides aminés, en plus de leur rôle dans la production des polypeptides, ont également différents rôles au sein de l'organisme. Par exemple, le tryptophane est essentiel pour la synthèse des pigments visuels, tandis que l'aspartate et le glutamate sont les seules sources d'azote disponibles aux bourdons (Chapman, 2012).

La proline semble être l'acide amine libre le plus présent dans la gelée royale. C'est également un acide aminé fortement présent dans l'hémolymphe des bourdons. Ce n'est peut-être pas un acide aminé essentiel, mais des études, notamment celle de Micheu *et al.*, 2000, ont déjà démontré son importance pour les métabolismes énergétiques lors du vol.

1.1.4.3. Polypeptides

Le pollen est la seule source de polypeptides disponible pour les bourdons (Klein & Raemakers, 2008).

La majorité des polypeptides de l'hémolymphe sont produites dans les corps gras. Ce sont également ces corps gras qui sont responsables de la production de la vitellogénine. Celle-ci sert à produire les polypeptides de nutrition des œufs (Chapman, 2012 ; Pirk, 2009). La quantité de polypeptides contenus dans le pollen joue un rôle important pour la reproduction, la croissance, l'immunocompétence, et la longévité des bourdons. Les polypeptides ont également un rôle de fixation des graisses, et de stock d'énergie (Vanderplanck *et al.*, soumis). Une carence en polypeptide dans l'alimentation des bourdons peut donc entraîner une diminution de la taille et de la masse de la descendance, ainsi qu'une stérilité des futures reines (Chapman, 2012).

C'est également dans ces corps gras que les polypeptides sont généralement dégradés en acides aminés. Cette dégradation peut également avoir lieu dans certains autres organes, mais de manière moins importante (Chapman, 2012).

1.2. Le déclin des bourdons

1.2.1. Généralités

Comme le rappellent Klein & Raemakers (2008), les causes du déclin des bourdons ont déjà fait l'objet de nombreuses études écologiques, associées à de nombreuses techniques d'observation.

Lorsque l'on évoque la disparition des bourdons, il peut être difficile de distinguer les causes des conséquences. Par exemple il peut être difficile de déterminer si le déclin d'une espèce entraîne la disparition d'une plante, ou si au contraire, la disparition d'une plante entraîne le déclin d'une espèce de bourdon (Klein & Raemaker, 2008).

À ce jour, plusieurs facteurs de déclin ont été tour à tour mentionnés. Parmi eux, citons : les perturbations des habitats (Goulson, 2010), l'augmentation de l'utilisation des pesticides (Goulson 2010), l'augmentation des populations invasives ou envahissantes (Nagamitsu *et al.*, 2006; Inoue *et al.* 2008), et les changements de diètes (Klein & Raemakers, 2008).

Pour ce qui est des perturbations des habitats, certaines espèces de bourdons ne nidifient que dans des milieux particuliers contenant des plantes spécifiques. Les modifications géographiques ou des altérations biochimiques de ces milieux entraînent donc une diminution du nombre de site de nidification potentiels (Goulson, 2010).

Une modification d'un habitat peut, par exemple, être entraînée par un développement agricole ou un changement de la flore locale. Un développement agricole cause à la fois des modifications physiques et chimiques du territoire, notamment à cause des défrichages et de l'enrichissement des sols par des engrais (Carvell *et al.*, 2006). Les plantes invasives, en plus de remplacer les espèces indigènes nécessaires à la vie des bourdons, sont aussi susceptibles de modifier le cycle des éléments chimiques, par exemple en puisant des nutriments plus profondément dans le sol, grâce à de plus grandes racines (Saad *et al.*, 2009).

L'intensification agricole est également un des principaux responsables de l'augmentation des pesticides et insecticides (Goulson, 2003 ; Benton, 2006). Ceux-ci peuvent causer la mort ou la malformation de nombreuses ouvrières et l'infertilité des reines (Goulson, 2010).

Les voies d'ingestion de ces produits sont le contact direct avec l'insecte, le contact avec des feuilles aspergées, et l'ingestion de nectar et pollen contaminé. Par exemple, différents tests tendent à montrer que les insecticides diméthoates et les carbofurans (figure 6) se retrouvent à des concentrations élevées dans le nectar des plantes contaminées (Goulson 2010).

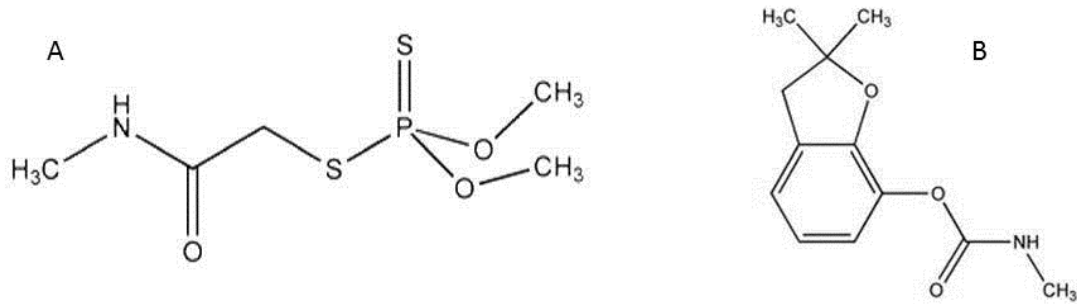


Figure 6: Molécules de diméthoates et carbofurans (source : www.pesticideinfo.org)

Il a été démontré au Japon que l'implantation d'espèce invasive (comme *B. terrestris*) réduit la diversité des espèces endémiques (Matsumura *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que ce remplacement n'était pas dû uniquement à une compétition alimentaire (Nagamitsu *et al.*, 2006), mais également à une éjection des sites de nidification (Inoue *et al.*, 2008). Les espèces invasives sont qui plus est susceptibles de servir de vecteur à des pathogènes qui, même s'ils sont supportés par les espèces vecteurs, peuvent entraîner la disparition des espèces endémiques (Stout and Morales, 2009).

Ces invasions sont dues à l'homme qui exporte notamment des bourdons dans des pays étrangers où l'espèce est absente, et ce, dans le but de favoriser la pollinisation des champs (Murray *et al.*, 2013).

Alors que chaque ouvrière d'une colonie tend à ne se spécialiser que sur une ou deux espèces de plantes, chacune de ces ouvrières ne sera pas spécialisée dans la collecte des mêmes ressources (Heinrich, 1983). Kleijn et Raemakers (2008) ont pu mettre en avant un lien entre les populations de bourdons locales, et la richesse des champs de fleurs à proximité. Ils démontrent que les espèces en déclin sont celles dont la diversité alimentaire sont en baisse depuis 1950, et qu'à contrario, les espèces ayant su développer une richesse alimentaire plus importante sont celles les mieux préservées. Ils remarquent également qu'une colonie ne peut pas avoir de descendance féconde tant qu'elle n'a pas atteint une certaine taille. Cette taille ne peut être atteinte en cas de trop grand déficit de nourriture et nutriments. Parmi leurs autres observations, il est également à noter que certaines plantes peuvent être visitées uniquement pour l'obtention de nectar, sans que les ouvrières ne s'intéressent au pollen.

1.3. Modèles étudiés

1.3.1. *Bombus terrestris*

La sous-espèce qui est utilisée dans le cadre de ce mémoire est la sous espèce *Bombus terrestris terrestris*. Il s'agit de la sous espèce la plus répandue dans toute l'Europe (Rasmont *et al.*, 2008). C'est cette sous espèce qui a été employée à la fois pour les élevages de micro-colonies, et pour certaines récoltes de pollen.

Comme le rappellent Kleijn et Raemakers (2008), *Bombus terrestris* n'est actuellement pas une espèce en déclin.

Bombus terrestris est une des espèces de bourdons les plus communes dans la région ouest paléarctique, et la deuxième plus commune en Belgique. Son expansion territoriale pourrait être mise sur le compte de sa domestication et de son importation intempestive, notamment en agriculture (Rasmont *et al.*, 2008).

L'élevage des *Bombus terrestris* a débuté en 1988 en Belgique et en Hollande avec des individus de la sous-espèce *B. terrestris terrestris* collectés localement (Rasmont *et al.*, 2008).

Les ouvrages de Løken (1973) et d'Amiet (1996) sur les méthodes de distinction des neuf sous-espèces de *Bombus terrestris* comptent toujours parmi les plus précis. Une des caractéristiques permettant leur distinction est la différence de coloration de leur thorax, de leur corps, et de leurs pattes.

Ces sous-espèces de *Bombus terrestris* sont : *africanus*, *audax*, *calabricus*, *canariensis*, *dalmatinus*, *lusitanicus*, *sassaricus*, *terrestris* et *xanthophus*.

Bombus terrestris est une espèce à langue courte (Leonhards & Blüthgen, 2012). Les bourdons à langue courte visitent une plus petite variété de plantes que ceux à langue longue pour la collecte de nectar (Goulson & Darvill, 2004). Les choix floraux de *Bombus terrestris* pour les récoltes de pollen consistaient en majorité à des Fabaceae comme *Trifolium repens* et *pratense*, ainsi que *Lotus cornicularis*, et d'autres ressources comme *Borago officinalis*, *Centaurea nigra*, *Buddleja davidi*, *Symphytum officinalis* et *Papaver rhoeas* (Klein et Raemakers (2008) ; Goulson *et al.* (2005)). Actuellement, la proportion de Fabaceae retrouvée dans leur alimentation a diminué. *Ononis spinosa* est apparu dans l'alimentation, et *Trifolium repens* se retrouve désormais plus consommé que *Trifolium pratense* (Carvell *et al.*, 2006). Les observations de Klein et Raemakers (2008) ont également mis en avant la présence de *Rubus* sp. en tant que nouveau composé majoritaire dans leur alimentation, ainsi que la présence de nouvelles ressources comme diverses Brassicaceae (indéterminées), *Echium vulgare*, *Impatiens glandulifera*, ou *Lythrum salicaria*.

Comme pour toutes les espèces de bourdons à langue courte, la variété de plantes visitées pour la collecte de nectar est plus grande que chez les espèces à langues longue (Goulson & Darvill, 2004).

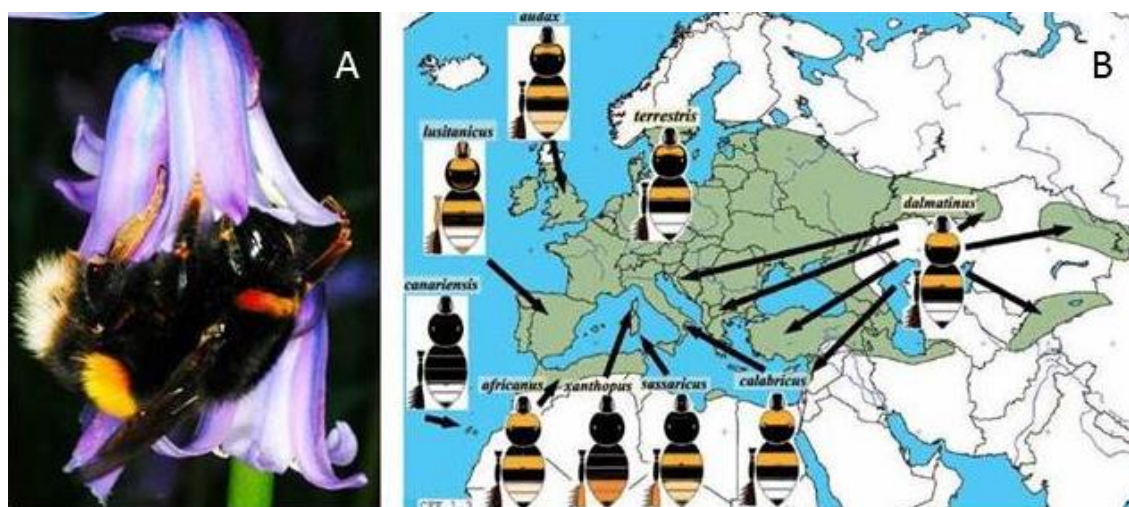


Figure 8: A : Photo de *Bombus terrestris* (source : A. Pauly) ; B : Schéma de la coloration et de la répartition des sous-espèces de *B. terrestris* (Rasmont *et al.*, 2008)

1.3.2. Plantes modèles

Dans le cadre de ce mémoire, les plantes étudiées sont *Trifolium repens*, *Rubus* sp. et *Calluna vulgaris*. *Trifolium repens* et *Calluna vulgaris* sont utilisés comme modèles de diète ancestrale, tandis que *Rubus* sp. est utilisé comme modèle de diète actuelle. La diète ancestrale correspond à un mélange de plantes qui étaient majoritairement consommées par *Bombus terrestris* avant 1950 (comme le montre la figure 7). La diète actuelle reprend des plantes consommées de nos jours par ces bourdons.

1.3.2.1. *Trifolium repens* et *Trifolium pratense*

Trifolium pratense et *Trifolium repens* sont des Fabaceae. Les Fabaceae sont, au même titre que les Lamiaceae et les Asteraceae des plantes dont le pollen est fortement apprécié par les bourdons (Carvell *et al.*, 2006). Il a été mesuré au Royaume Uni que *Trifolium pratense* constitue 74% de la quantité de nourriture des larves (Goulson & Darvill, 2004).

Le régime alimentaire des bourdons comporte généralement plus de *Trifolium pratense* que de *Trifolium repens*. Néanmoins, les plantes phylogénétiquement proches ayant une composition chimique très proche (Roulston *et al.*, 2000), l'une peut être utilisée pour remplacer l'autre au sein d'une étude.

Le *Trifolium repens*, ou trèfle rampant et une plante très commune en Europe. Elle se retrouve notamment dans les prairies, parcs, et bords de chemins. Cette plante rampante à la capacité de s'enraciner au niveau des nœuds de sa tige (Schauer and Caspari, 2009).

Le pollen de *Trifolium repense* est de forme oblongue et légèrement granuleux, avec une fente longitudinale (Moore *et al.*, 1991).

Très peu d'étude ont actuellement été réalisées sur ces deux plantes. Parmi celles-ci, celle de Parent *et al.* (1990) tend à montrer qu'une saison chaude et pluvieuse favorise la production de nectar chez *Trifolium repens*, tandis que celle de Carvell *et al.* (2006) indique que cette espèce ne peut être pollinisée que par des espèces de bourdons à langue courte.

Les études de Kleijn et Raemakers (2008) ainsi que de Goulson et Darvill (2004) montrent que contrairement au *Trifolium pratense* dont la consommation par les bourdons est en chute depuis ces 60 dernières années, la consommation de *Trifolium repens* reste relativement stable, bien que faible.

Les travaux de Somme *et al.* (soumis) ont permis de déterminer les concentrations moyennes en polypeptides, en stérols, et en acides aminés totaux du pollen lyophilisé de *Trifolium pratense*, ainsi que la proportion d'acides aminés essentiels parmi les acides aminés totaux et la proportion relative de chaque stérol (tableaux 1 et 2).

Tableau 1: Concentration en polypeptides, en acides aminés totaux, la fraction d'acides aminés essentiels parmi ces acides aminés totaux, et la concentration en stérols du pollen de *Trifolium pratense* lyophilisé (Somme *et al.*, soumis)

	Concentration en polypeptides (%)	Concentration en acides aminés totaux (%)	Pourcentage d'acides aminés essentiels parmi les acides aminés totaux (%)	Concentration en stérols (%)
<i>Trifolium pratense</i>	40.15 ± 11.93	25.16 ± 3.22	51.99 ± 0.11	9.98 - 10.50

Tableau 2: Concentration relative de chaque composé stérolique du pollen de *Trifolium pratense* exprimée en pourcentage de la fraction stérolique totale. Les composés en gras sont les stérols majoritaires (ceux dont la fraction représentée est supérieure à 5% de la quantité stérolique totale) (Somme *et al.*, soumis)

	Pourcentage de chaque fraction par rapport aux stérols totaux de <i>Trifolium pratense</i> (%)
Cholestérol	1.24 - 3.30
Desmostérol	Inférieur au seuil de détection
24-Méthylcholestérol + Campesterol	53.55 - 61.21
Stigmastérol	1.67 - 3.11
sitostérol	5.21 - 10.35
5-avenastérol	20.99 - 23.20
Cholesténone	2.35 □ 3.18
7-stigmastérol	2.32 □ 3.55
7-avenastérol	1.04 □ 1.70

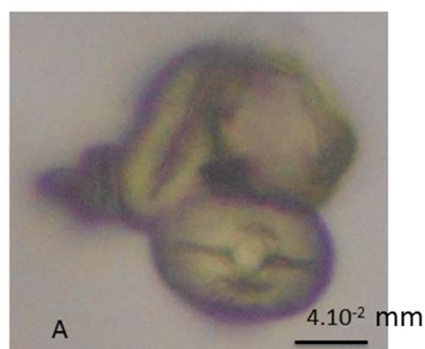


Figure 9: A: *Trifolium repens*; B: Pollen de *Trifolium repens* (photos de J. Sturbois)

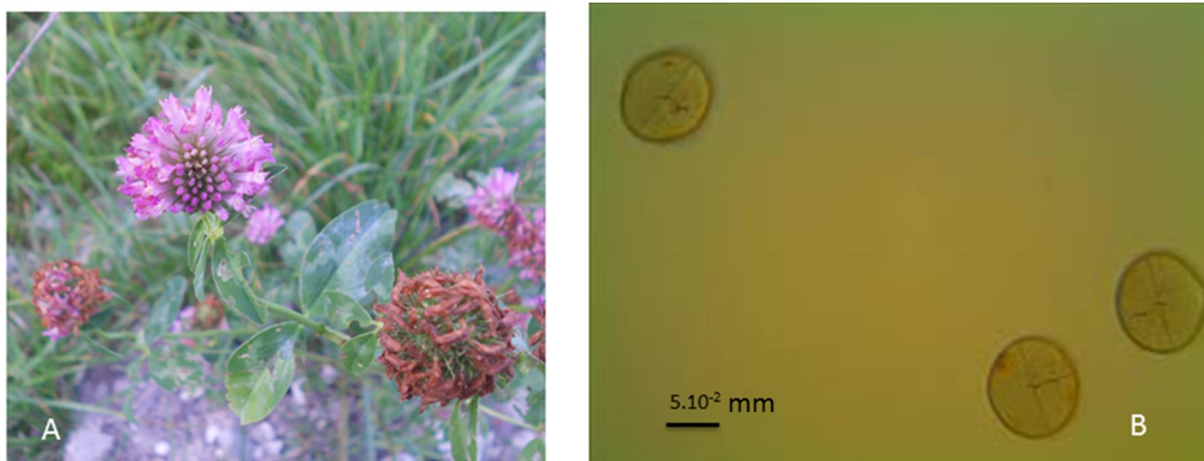


Figure 10: A: *Trifolium pratense*; B: Pollen de *Trifolium pratense* (photo de J. Sturbois)

1.3.2.2. *Rubus* sp.

Les plantes du genre *Rubus* appartiennent à la famille des Rosaceae.

Les 305 espèces retrouvées en Belgique (Lambinon *et al.*, 2004) sont extrêmement difficile à distinguer uniquement de par leur pollen. Ces plantes appartiennent soit à la strate herbacée, soit à l'arborescente. Le genre *Rubus* est distinguable notamment par ses feuilles foliées et à ses tiges épineuses (Schauer et Caspari, 2009).

Ces grains de pollens sont de forme plus ou moins discoïdale, pincées à trois extrémités disposées selon les sommets d'un triangle équilatéral (Moore *et al.*, 1991).

Rubus est une plante dont la consommation a augmenté dans les diètes de nombreuses espèces de bourdons au cours du XX^{ème} siècle, que ce soient des espèces à la population stable ou en déclin. Chez plusieurs de ces espèces, *Rubus* est même devenu une des principales ressources consommées (Kleijn & Raemakers, 2008).

Très peu d'étude ce sont déjà consacrées à l'étude des compositions chimiques des pollens de *Rubus* sp. De récents travaux ont déterminés la proportion moyenne de polypeptides contenus dans du pollen lyophilisé de *Rubus* sp. (tableau 3) (Tasei & Aupinel, 2008).

Tableau 3: Concentration en polypeptides de pollen de *Rubus* sp. lyophilisé, exprimé en pourcents (Tasei & Aupinel, 2008)

	Concentration en polypeptides (%)
<i>Rubus</i> sp.	19.2



Figure 11: A: Exemple de *Rubus* sp.; B: Pollen de *Eubus sexatilis* (photos de J. Sturbois)

1.3.2.3. *Calluna vulgaris*

Calluna vulgaris est une plante de la famille des Ericaceae. Cette plante commune en Europe se retrouve notamment dans les landes, les pelouses maigres et les chênaies, au niveau de la strate sous-arbustive (Schauer & Caspari, 2009).

Le pollen de *Calluna vulgaris* est formé de quatre petites sphères regroupées en pyramide (Moore *et al.*, 1991).

La présence de nombreuses landes à callune en Angleterre, au Pays-Bas, et en Belgique est la cause citée par Kleijn & Raemakers (2008) expliquant sa présence dans les diètes de nombreux bourdons avant 1950.

Vanderplanck *et al.* (2008) a réalisé de nombreuses analyses chimiques sur le pollen lyophilisé de *Calluna vulgaris*. Celles-ci concernent la fraction de polypeptides, de stérols, et d'acides aminés qu'il contient. Elle s'est également particulièrement intéressée à la fraction d'acides aminés essentiels et non essentiels, libres ou attachés, ainsi qu'à la proportion de chaque composé stérolique (tableau 4, 5, et 6).

Tableau 4: Concentration en polypeptides, en acides aminés totaux, et en stérols du pollen de *Calluna vulgaris*. lyophilisé (Vanderplanck *et al.*, 2008)

	Concentration en polypeptides (%)	Concentration en acides aminés totaux (%)	Concentration en stérols (%)
<i>Calluna vulgaris</i>	2.24 ± 0.38	13.53 ± 0.86	0.73 ± 0.21

Tableau 5: Concentration en polypeptides, en acides aminés totaux, et en stérols du pollen de *Calluna vulgaris* lyophilisé (Vanderplanck *et al.*, 2008)

	Acides aminés liés (%)	Acides aminés essentiels parmi les acides aminés liés (%)	Acides aminés libres (%)	Acides aminés essentiels parmi les acides aminés libres (%)
<i>Calluna vulgaris</i>	13.30	49.43	0.23	45.90

Tableau 6: Concentration relative de chaque composé stérolique du pollen de *Calluna vulgaris* exprimée en pourcentage de la fraction stérolique totale. Les composés en gras sont les stérols majoritaires (ceux dont la fraction représentée est supérieure à 5% de la quantité stérolique totale) (Vanderplanck *et al.*, 2008)

	Pourcentage de chaque fraction par rapport aux stérols totaux de <i>Calluna vulgaris</i> (%)
Cholestérol	4.01 ± 1.38
Desmostérol	0.09 ± 0.10
24-Méthylcholestérol + Campesterol	6.28 ± 2.23
Stigmastérol	0.57 ± 0.19
sitostérol	25.96 ± 2.89
5-avenastérol	37.86 ± 3.07
Cholesténone	0.64 ± 0.61
7-stigmastérol	4.36 ± 0.31
7-avenastérol	20.23 ± 4.21

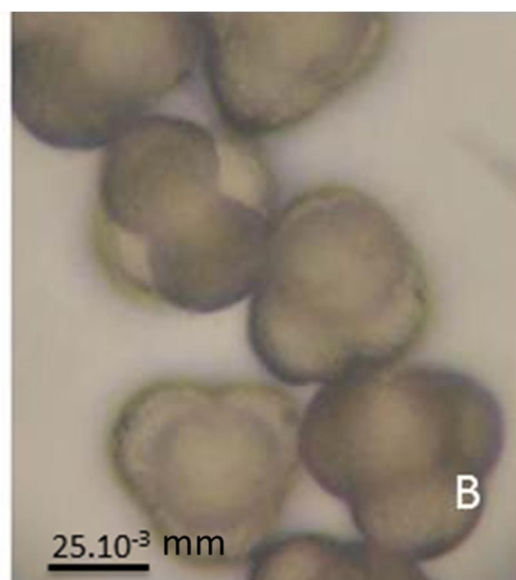


Figure 12: A: *Calluna vulgaris*; B: Pollen de *Calluna vulgaris* (photos de J. Sturbois)

2. Objectifs

Les bourdons sont d'importants pollinisateurs, souvent utilisés en agriculture biologique. Leur conservation est donc un sujet important pour de plus en plus de personnes, qu'ils soient des scientifiques, des agriculteurs, ou des politiques.

Une des principales cause du déclin de ces pollinisateurs est la modification de leurs ressources florales nécessaires à leur besoin en pollen et en nectar. Des analyses de pelotes ont permis de mettre en évidence une stratégie de changement de diète (Klein & Raemakers, 2008).

Ce présent mémoire vise à déterminer les conséquences provoquées par un changement de diète sur le développement de *Bombus terrestris*.

Cet impact est déterminé par la différence de taille de la descendance de plusieurs micro-colonies ayant été nourries de différents régimes. Ces régimes sont composés de *Trifolium repens*, de *Rubus sp.* et de *Calluna vulgaris* en proportions variables.

Alors que *Trifolium repens* et *Calluna vulgaris* ont été utilisés comme modèle de diète dominante en début de XX^{ème} siècle, *Rubus sp.* est utilisé comme modèle de diète plus contemporaine.

En plus de l'étude de cette influence sur le développement larvaire, des comparaisons entre les différentes compositions chimiques et sur la digestibilité des différents pollens employés sont également réalisées. De cette manière, il est possible d'établir diverses hypothèses sur les causes de ces différences/ressemblances entre diètes.

Notre hypothèse est que les bourdons sont capables de sélectionner une nouvelle ressource en fonction de leurs besoins. Ils seraient ainsi susceptibles de comparer différentes ressources, et d'en remplacer une déclinante par une nouvelle aux propriétés biochimiques similaires.

3. Matériel et Méthodes

3.1. Collectes de pollen

Les différents pollens utilisés dans le cadre de ce mémoire sont des pollens de *Trifolium repens*, de *Rubus sp.* et de *Caluna vulgaris*.

L'objectif de ce mémoire est de vérifier la viabilité des changements de diète observés par Klein et Raemakers (2008). Dans leurs résultats concernant les espèces stables ou en augmentation de population, une forte diminution de la consommation de *Trifolium pratense* est observée, contrebalancée par une apparition de *Rubus sp.* en tant que composé majoritaire des diètes.

Pour ce mémoire, du pollen de *Trifolium repens* a été utilisé à la place de celui de *Trifolium pratense* pour représenter la diète ancestrale. En effet, nous avons remarqué au cours des récoltes de pollen qu'*Apis mellifera* ne collectait pas de pollen sur *Trifolium pratense*. Par contre, il a été possible de leur faire collecter rapidement une grande quantité de pollen sur *Trifolium repens*.

Les pollens de *Trifolium repens* et de *Rubus sp.* ont été collectés à l'aide de ruches d'abeilles domestiques placées dans des champs de la plante correspondante, tandis que celui de *Caluna vulgaris* est un pollen commercial commandé à la firme Bee Api.

Il est possible de récupérer le pollen collecté par les abeilles mellifères à l'aide de trappes à pollen (figure 13). Ces trappes consistent en une grille permettant le passage des abeilles, tout en étant suffisamment étroite pour frotter contre leurs pattes et faire tomber leurs pelotes de pollen. L'efficacité de cette trappe n'étant pas de 100%, la colonie récolte toujours suffisamment de ressources pour survivre. En effet, certaines ouvrières sont plus petites que les autres, ce qui leur permet de passer sans perdre leurs pelotes. Ce pollen est récolté tous les deux jours afin d'éviter la dégradation due aux facteurs naturels (température, humidité, activité microbienne, etc.).



Figure 13: A: Ruche d'*Apis mellifera* équipée d'une trappe à pollen; B: Trappe à pollen; C: Bac récolteur de pollen (source : J. Sturbois)

Ces pelotes de pollen ont toutes été triées manuellement en fonction de leur couleur pour ne garder que le pollen correspondant à celui de la plante étudiée. Pour déterminer la couleur de pelote correspondant au type de pollen désiré, plusieurs échantillons de chaque couleur ont été prélevés et observés au microscope. Les grains de pollen observés ont été comparés aux photos du livre Pollen Analysis de Moore *et al.* (1991).

Les pollens récoltés sont conservés au congélateur à une température de -24°C pour stopper toute dégradation microbienne.

Le pollen destiné à servir de nourriture pour les micro-colonies est conservé tel quel, tandis que celui destiné aux analyses chimiques est d'abord broyé et lyophilisé.

3.2.Élevage de micro-colonies

Les élevages de micro-colonies sont réalisés avec les conditions et les méthodes décrites par Tasei et Aupinel (2005) ainsi que par Moerman (2011).

3.2.1. Dispositif expérimental

Les comparaisons de diètes ont été réalisées sur des micro-colonies de *Bombus terrestris terrestris*. Pour former des micro-colonies, des ouvrières d'âge similaire provenant d'une colonie mère fournie par la firme Biobest sont séparées quatre par quatre dans des cages d'élevage. Chacune de ces cages d'élevages est munie d'un fond grillagé et est placée sur une plaque de plastique. De cette manière, il est aisément possible de récupérer régulièrement les excréments de chaque micro-colonie (figure 14).

Le pollen est placé à l'intérieur de la micro-colonie sous forme de candi, tandis que le sirop (biogluc®) est stocké dans un récipient placé sous la micro-colonie. Ce récipient est fermé afin d'éviter une éventuelle contamination fécale, et percé afin de permettre la montée de sirop par capillarité. Les bourdons se nourrissent en biogluc® en venant lécher ce capillaire de coton.

Chacune de ces colonies dispose d'un accès *ad libitum* au sirop biogluc et aux candis de pollen fourni.

Les individus restant de la colonie mère ont été conservés pendant la semaine suivant la formation des micro-colonies afin de permettre de remplacer les éventuelles ouvrières mortes.

Cette colonie est conservée en étant nourrie au pollen de *Salix caprea*. Il s'agit d'une excellente ressource pour le développement des bourdons (Pouvreau (2004) ; Tasei & Aupinel (2008)). De cette manière, les ouvrières qui sont susceptibles d'être rajoutées à une colonie auront eu une alimentation correcte lors de leur développement, et n'auront pas été affectées par une diète expérimentale autre que celle qu'elles devront subir.



Figure 14: Micro-colonie de *Bombus terrestris*

3.2.2. Conditions d'élevage

Ces micro-colonies ont été placées dans une salle d'élevage dont la température (environ 30°C) et l'humidité (entre 60 et 70%) sont réglées pour les maintenir en bonne santé. Ces conditions expérimentales correspondent plus ou moins à celles qui peuvent être retrouvées dans un nid naturel.

Les manipulations dans cette pièce sont réalisées sous lumière rouge, dont le spectre n'est pas visible pour les bourdons. De cette manière, ceux-ci sont moins agressifs et n'essaient pas de s'échapper lors de l'ouverture du bac.

L'espace inter-micro-colonie a été maximisé afin de limiter les contacts entre elles. Ceux-ci sont en effet susceptibles de perturber les pontes de certaines ouvrières. Cette perturbation peut être causée par la dominance qu'exerce une ouvrière sur ses congénères.

3.2.3. Méthodes d'élevage

Les micro-colonies sont regroupées en quatre catégories, en fonction du type de diète qui leur est fournie (tableau 7). Chacun de ces régimes est fourni à sept micro-colonies différentes pendant trois semaines.

Ces régimes sont :

Tableau 7: Composition des différentes diètes étudiées

Micro-colonies	Diète
1 à 7 (série I)	33% <i>Trifolium repens</i> , 33% <i>Rubus sp.</i> et 33% <i>Caluna vulgaris</i>
8 à 14 (série II)	20% <i>Trifolium repens</i> , 47% <i>Rubus sp.</i> et 33% <i>Caluna vulgaris</i>
15 à 21 (série III)	100% <i>Trifolium repens</i>
22 à 28 (série IV)	100% <i>Rubus sp.</i>

De cette manière, nous pouvons évaluer le remplacement progressif du pollen de *Trifolium repens* par du pollen de *Rubus sp.*

En plus de ces micro-colonies, d'autres ont été utilisées à titre de témoins, négatif dans le cas de celles élevées sur *Cistus sp.*, et positif pour celles élevées sur *Salix sp.* (tableau 8) (Moerman, 2011).

Tableau 8: Composition des diètes de référence (source: Moerman, 2011)

Micro-colonies	Diète
1 à 7 (série A)	100% <i>Cistus sp.</i>
8 à 14 (série B)	100% <i>Salix sp.</i>

Ce pollen a été fourni aux colonies sous forme de candi. Celui-ci est réalisé en mélangeant un total de 15 g de pelotes de pollen broyées à 2 ml de biogluc.

Par souci de conservation, le candi est stocké au congélateur à -24°C entre chaque utilisation, et un nouveau est réalisé tous les sept jours.

3.2.4. Paramètres mesurés

Les paramètres calculés à partir des élevages de micro-colonies sont également ceux tirés des travaux de Tasei et Aupinel (2005) et de Moerman (2011).

3.2.4.1. Consommation de pollen et de sirop

Un candi pesé avec précision est fourni tous les deux jours. Le reste du candi précédemment fourni est récupéré et pesé.

En complément, chaque micro colonie a également accès *ad libitum* à du sirop biogluc. Une fois les élevages finis, la différence entre le volume fourni au début des manipulations et le volume restant permet de déterminer la nécessité qu'avait chaque micro-colonie en termes de consommation de sucre.

Le biogluc est un sirop constitué d'un mélange d'eau, de sucre, de vitamines et de minéraux qui est utilisé pour dans l'élevage industriel de bourdons.

3.2.4.2. Masse des larves

Les individus des micro-colonies ont été tués par congélation deux semaines après leur première ponte.

À ce moment, les larves que les couvains contenaient étaient au maximum âgées de 14 jours. Les couvains ont alors été ouverts à l'aide d'une lame de scalpel, et, s'il ne contenait qu'une seule larve, celle-ci a été pesée. Les larves mortes à l'intérieur de leur couvain ou déjà au stade pupal n'ont pas été incluses dans la masse larvaire totale.

La pesée s'effectue avec une précision au milligramme à l'aide d'une balance analytique.

Les données récoltées lors de cette manipulation sont le nombre de larves, la masse de chacune d'elles, le numéro de la colonie à laquelle elles appartenaient et le régime alimentaire auquel elles ont été soumises. Ces données ont été classées dans un tableau. La majorité des calculs d'efficacité pollinique s'effectue sur base de ces données.

3.2.4.3. Efficacité du pollen

L'efficacité du pollen est un indice calculé à partir des résultats de consommation de pollen et de masse des larves. C'est à partir de cet indice que les analyses statistiques de comparaison de pollen s'effectuent.

Il est calculé comme étant le rapport du poids total des larves produites par la micro-colonie divisé par la quantité de candi consommé par la micro-colonie pendant son développement.

$$\text{Efficacité du pollen} = \text{Masse larvaire totale} / \text{Consommation de pollen de la micro-colonie}$$

Une diète efficace est donc une diète produisant le plus de larves ou les larves les plus grosses pour une consommation en pollen la plus faible.

3.2.4.4. Analyse d'excréments

Les excréments ont été récupérés tous les sept jours afin de tester la digestibilité de chaque mélange. Pour ce faire, et comme réalisé par Fernandes-Da-Silva et Serrão (2000), ils ont été placés entre lame et lamelle après avoir subi un traitement au bleu de méthylène, et ont ensuite été observés au microscope. Ce traitement consiste à réduire en poudre 10 mg d'excréments et de les mélanger à 1 ml de bleu de méthylène. Contrairement à Fernandes-Da-Silva et Serrão (2000), les excréments comparés ici ne proviennent pas directement du tube digestif des bourdons. En effet, le plus petit nombre d'individus utilisés n'auraient pas permis d'en collecter suffisamment pour le reste de la manipulation.

La digestibilité de chaque type de pollen est déterminée par le rapport du nombre de grains de pollen digérés par le nombre de grains totaux. Cette digestibilité est déterminée sur des excréments de micro-colonies n'ayant été nourries qu'avec un seul type de pollen.

Ces rapports s'effectuent sur les grains de pollen visibles dans un champ au microscope. Les grains de pollen non-digérés apparaissent entièrement colorés et plus sombres (figure 15 A), tandis que les grains digérés, dont le centre a été vidé apparaissent comme un disque bleu au centre plus clair, presque blanc (figure 15 B).

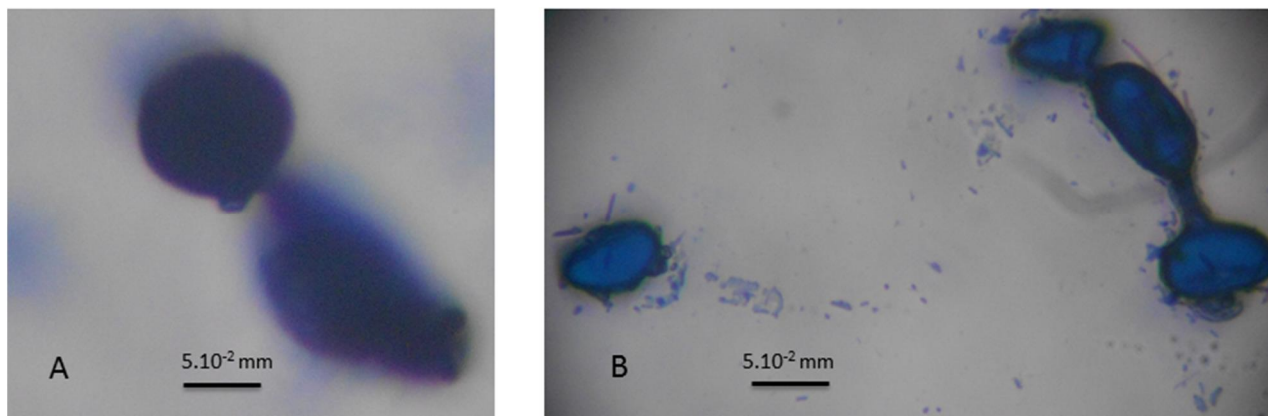


Figure 15: Pollen de *Trifolium repens* coloré au bleu de méthylène; A: Grain non digéré; B: Grains digérés

3.3. Analyses chimiques

3.3.1. Stérols

La méthode suivie pour extraire et déterminer les stérols des pollens est celle présentée par Vanderplanck *et al.* (2011). Les manipulations d'extraction ont été réalisées au service de Zoologie de l'université de Mons du Professeur P. Rasmont, tandis que les analyses par spectrométrie de masse ont été effectuées au service de Chimie Analytique de la faculté universitaire des sciences agronomiques de Gembloux du Professeur G. Lognay.

Chaque extraction nécessite 20 mg de pelotes de pollen broyées puis lyophilisées. La masse exacte de pollen doit être déterminée au dixième de milligramme à l'aide d'une balance analytique afin de pouvoir calculer la proportion de stérol qu'elle contient.

Une fois l'échantillon préparé, l'extraction de stérols s'effectue en quatre étapes :

- Une saponification
- Une extraction de l'insaponifiable
- Une chromatographie sur couche mince
- Une silylation

Pour la première étape de la saponification, le pollen est placé dans un grand tube sovirol, auquel 2.5 ml de KOH méthanolique 2M est ajouté. L'ensemble est ensuite vortexé, puis, placé 1h au bain marie à 80°C. Durant ce bain marie, le bouchon de chaque tube doit régulièrement être resserré, et le tube agité.

Après ce bain marie et une fois le tube refroidi, 1 ml de standard interne de bétuline (ISTD) 0.05 mg/ml et 2.5 ml d'eau milliQ y sont ajoutés. Le tout est vortexé afin de s'assurer que tous les produits soient bien mélangés.

Le standard interne de bétuline permet de déterminer par la suite les concentrations des différents stérols. Cette détermination s'effectuera par comparaison des aires des pics obtenus au GC.

Ce mélange est placé dans une ampoule à décanter et 5 ml d'éther diéthylique y sont ajoutés. Celle-ci est agitée délicatement pour mélanger les deux phases visibles tout en évitant de former une émulsion. Après un temps de repos, les deux phases se reforment avec la phase savonneuse en dessous, et la phase insaponifiable au-dessus.

Les stérols étant insaponifiables, l'étape suivante consiste à extraire cette phase insaponifiable et éliminer la phase savonneuse.

Le robinet de l'ampoule est ouvert afin de récupérer la phase savonneuse. La phase insaponifiable intéressante est, elle, transférée dans une autre ampoule à décanter. La phase savonneuse va subir au total trois rinçages à l'éther diéthylique. Après ces trois rinçages, l'ampoule est rincée avec un peu d'éther diéthylique afin de bien récupérer tous les stérols.

Cette phase éthérée subit trois rinçages à l'eau milliQ réalisés de la même manière que les précédents. Les particules d'eau résiduelles de cette phase éthérée sont éliminées en étant filtrées sur du sulfate de sodium anhydre. Cette ampoule et son filtre sont également rincés à l'éther diéthylique pour minimiser les pertes stéroliques.

Le solvant est éliminé par évaporation à l'évaporateur rotatif. Lors de cette étape, il faut faire attention à ce que le solvant n'entre pas en ébullition pour éviter de perdre des stérols par éclaboussure dans la machine.

Pour pouvoir réaliser la chromatographie sur phase mince, le résidu sec résultant est remis en solution à l'aide de chloroforme.

Cette solution est déposée sous forme d'une ligne sur une plaque de silice à l'aide d'un rail. Un standard de chromatographie est placé de part et d'autre de cette bande afin de permettre de trouver le cholestérol et la bétuline après la migration. Cette migration s'effectue dans une cuve contenant un solvant de migration constitué d'ammoniaque (2.5 ml), de l'éther (50 ml) et du chloroforme (450 ml).

Quand la migration est terminée et la plaque séchée, une couche de dichlorofluoresceine permet de mettre en évidence les différents fronts de migrations. Ces traces sont révélées en étant passées aux UV (254nm). Dans le cadre de ce mémoire, les bandes intéressantes sont celles contenant les stérols. Elles sont repérables par leur positionnement entre les traces de cholestérol et de bétuline du marqueur de référence.

Ces stérols sont récupérés en grattant la silice qui les contient. Celle-ci est par la suite transférée dans un tube soviel auquel 5 ml chloroforme sont ajoutés afin de remettre les stérols en suspension. Après sédimentation de la silice, le chloroforme est récupéré et

transféré dans un ballon piriforme. Deux autres extractions avec 3 ml de chloroforme sont réalisées par la suite.

Le chloroforme est ensuite éliminé par évaporation à l'évaporateur rotatif. La température de ce dernier est réglée à 60°C afin de faire s'évaporer le chloroforme sans dénaturer les stérols qu'il contient.

Les résidus secs sont ensuite redilués dans 1 ml de chloroforme. Ce mélange est filtré dans une pipette Pasteur bourrée d'ouate afin d'éliminer les résidus de silice. Un second millilitre de chloroforme est employé afin de bien rincer le ballon.

Le chloroforme résiduel de ces manipulations est éliminé par évaporation sous azote.

Les stérols obtenus lors de ces manipulations subissent ensuite une silylation. Cette étape augmentera l'efficacité du GC lors de l'analyse de la composition des stérols.

La première phase de cette silylation consiste à ajouter 50µl de pyridine anhydre et de BSTFA-TMCS à l'échantillon, puis, de le placer une demi-heure au bain marie à 90°C. La seconde phase est l'élimination de la phase liquide résiduelle par évaporation sous azote.

Les stérols sont ensuite remis en suspension dans 200µl d'hexane pour pouvoir être injectés.

L'analyse des stérols se fait par chromatographie en phase gazeuse (GC) dans un GC-FID. Ils sont injectés dans un circuit, et le temps nécessaire pour qu'ils en sortent, permet de déterminer le type de stérol. La détermination de ces temps est effectuée par comparaison à ceux d'une référence à l'huile de tournesol.

Les concentrations exactes en chaque stérol sont calculées par comparaison avec la concentration en bétuline. Celle-ci ayant été ajoutée à une concentration connue, elle permet de calculer ce que représente un pic d'aire connue. Les pics de méthylène cholestérol et de campestérol sont néanmoins indissociables par cette méthode, du fait de leur même temps de sortie du GC.

Les chromatogrammes obtenus sont traités par le logiciel Chrom-Card data system (version 2.3.3) (Thermo Electron Corporation).

3.3.2. Polypeptides

Le protocole mis au point par Vanderplanck *et al.* (2013) a été utilisé pour l'extraction des polypeptides. Il est adapté de celui de Wang *et al.* et prend en compte la résistance à la plupart des produits chimiques qu'accorde leurs parois (intine et exine) aux grains de pollen. L'extraction et l'analyse des pollens se sont déroulées dans le service de Protéomique et de Microbiologie de l'Université de Mons du Professeur R. Wattiez

Pour chaque extraction, 5 mg de pelotes de pollen broyées et lyophilisées sont employées. La masse exacte de pollen (au dixième de milligramme) doit être connue afin de pouvoir déterminer par la suite la proportion de polypeptides du pollen. Ce pollen doit être broyé à l'aide d'une même masse de billes en verre jusqu'à l'obtention d'une fine poudre. Cette opération s'effectue sous azote liquide. Cette manipulation réalisée cinq fois a pour but de faciliter l'élimination de contaminants et l'extraction des polypeptides. Le fait de l'effectuer sous azote permet de limiter les diverses dégradations polypeptidiques.

L'extrait polypeptidique en résultant subit ensuite trois séquences de lavage-précipitation successives avec retrait de la phase liquide entre chaque. La première se fait dans un mélange TCA/acétone 10%, la seconde dans un mélange de méthanol 80% et d'ammonium 0.1M, et la dernière dans une solution d'acétone 80%. Cette dernière séquence a pour but d'éliminer les résidus de TCA. Lors de chaque étape, le produit est ajouté à la phase solide de la précédente, le tout est passé au vortex pour maximiser les interactions produit-pollen, puis centrifugé à 13.2 rpm pendant 3 minutes pour séparer les deux phases. Ces différents lavages et précipitations sont effectués en chambre froide et sur glace, à nouveau afin de limiter les dégradations de polypeptides.

L'extraction des polypeptides s'effectue toujours en chambre froide, sur les résidus secs résultant de ces opérations. Un tampon d'extraction SDS y est ajouté et le tout est ensuite soniqué sur glace pendant 10 minutes. Le mélange, après y avoir ajouté du phénol, a ensuite subi une incubation sous agitation pendant à nouveau 10 minutes. La phase phénolique supérieure de l'extrait est, après 10 minutes de centrifugation à 13.2 rpm, transférée dans un nouveau tube. Ce tube est complété par du méthanol contenant 0.1M d'ammonium acétate. Les tubes finaux ont ensuite dû être laissés au repos à -20°C pendant au moins une nuit.

À la reprise de la manipulation, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 13.2 rpm afin de faire précipiter les polypeptides dans le fond de l'épandeur. Une fois le surnageant éliminé, les précipités ont subi plusieurs lavages. Un premier au méthanol glacé 100%, et un second à l'acétate glacé 80%. Chaque lavage s'effectue par l'ajout de 1.5 ml du produit, avant de le mélanger aux polypeptides par un passage au vortex. Une précipitation des polypeptides s'effectue ensuite en faisant passer l'échantillon 5 minutes à la centrifugeuse à 13.2 rpm. Enfin, le surnageant est éliminé de l'épandeur. Après le second lavage, les précipités ont été laissés à sécher à l'air libre.

Ces pellets protéiques ont ensuite été remis en suspension dans un tampon à 4M de chlorydrate de guanidine

La quantification de la quantité protéique totale de ces pellets s'effectue également suivant la méthode de Vanderplanck *et al.* (2013), c'est à dire à l'aide du kit de quantification protéique BCA (Pierce, Thermo Scientific). Le BCA fait partie d'un réactif qui, associé à un ion Cu^+ change de couleur. Cet ion Cu^+ est issu de la réduction d'un ion Cu^{2+} par des polypeptides. Neuf dilutions connues d'albumine bovine servent à créer une courbe standard. Cette courbe standard permet de déterminer la concentration en polypeptide de l'extrait. Pour augmenter la précision, chaque échantillon est analysé en triplicat.

Ces triplicats sont ensuite incubés pendant 30 minutes sous agitation à 37°C. Après cette incubation, l'absorbance à 570 nm est lue. Elle est lue juste après la sortie d'incubation, 5 minutes après la sortie d'incubation, et 10 minutes après.

3.3.3. Acides aminés

Les échantillons ont été analysés à l'université de Liège, dans le laboratoire de Chimie Biologique et Industrielle du professeur B. Wathelet, et l'extraction des acides aminés y a été effectuée via le protocole mis au point par Vanderplanck *et al.* (2013).

3.3.3.1. Acides aminés totaux

Les acides aminés totaux sont extraits en ajoutant 1 ml de solution d'hydrolyse constituée de 6N HCl, 0.1% de phénol et 500 μ M de norleucine à 5 mg de pollen broyé lyophilisé. La norleucine est utilisée comme standard interne.

Ce mélange est placé 1 minute sous azote afin de limiter la dégradation de la méthionine, puis, incubé pendant 24 heures à 110°C. La fraction résultante de cette opération est ensuite évaporée sous vide dans un bain à 100°C jusqu'à séchage complet.

Le résidu sec est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon sodium citrate de pH 2.2. Après avoir été bien mélangée, et un passage sur un filtre de 0.2 μ m, la solution est stockée dans un vial HPLC.

Après cette extraction, chaque acide aminé est ensuite mesuré séparément à l'aide d'un chromatographe à échange d'ion (Biochrom 20plus amino acid analyser). Une post-colonne ninhydrine permet une réaction colorée qui est ensuite mesurée par un détecteur à UV.

3.3.3.2. Acides aminés libres

Pour les acides aminés libres, ce sont 200 μ l d'une solution d'extraction composée de 1 nM de norleucine, 0.1 N HCL et 2% de thiodiglycérol qui sont ajoutés à 50 mg de pollen broyé et lyophilisé. La norleucine servant à nouveau de standard interne.

La première étape de l'extraction consiste à mettre ce mélange dans un bain à ultra-sonication pendant 30 minutes. 100 μ l d'acide 5-sulfosalicylic dihydraté 15% y sont ensuite ajoutés pour permettre la précipitation des polypeptides lors d'un bain à ultra-sonication de 5 minutes. Après une centrifugation de 5 minutes à 11000 rpm, 250 μ l du surnageant sont versés dans un tube à microcentrifugation doté d'un filtre de 0.2 μ m. Le tout est ensuite centrifugé à 10000 rpm et les membranes sont par la suite filtrées pendant 10 minutes. 100 μ l d'une solution d'ajustement de pH composée en proportions 1 pour 1 de 1.5 N NaOH et de tampon à pH 2.2 sont ajoutés à 240 μ l du nouveau surnageant. Le tout est mesuré dans le même analyseur d'acides aminés que précédemment.

3.4. Analyses statistiques

Les tests statistiques et les visualisations graphiques associées ont toutes été réalisées via le programme R version 3.0.0. (The R Foundation for Statistical Computing).

3.4.1. Analyses univariées : boîtes de dispersion (boxplot) et analyse de la variance (ANOVA/Kruskal-Wallis)

Les teneurs en stérols totaux, en acides aminés totaux et en polypeptides ($\mu\text{g}/\text{mg}$) ainsi que les efficacités (g/g) et les digestibilités (%) des différentes diètes sont visualisées à l'aide de graphiques de type « boîtes de dispersion » (boxplot).

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

Lorsque le test statistique retourne une *p-value* inférieure à 0.05, un test post-hoc (comparaisons multiples paire par paire) est effectué afin de pouvoir structurer les données et cibler précisément la (les) différence(s) significative(s) détectée(s) entre les différentes diètes. La structuration des données est également illustrée sur le graphe à l'aide d'indices lettrés, deux boîtes partageant un même indice lettré n'étant pas significativement différente l'une de l'autre.

3.4.2. Analyses multivariées : positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS) et analyse de la variance multivariée par permutation (perMANOVA)

Les méthodes d'analyses multivariées sont généralement utilisées en biologie pour traiter des données concernant des communautés écologiques. La similitude entre les tableaux de données chimiques et les tableaux de données de communautés écologiques permet de généraliser ces méthodes aux traitements de compositions chimiques.

Dans le cadre de cette étude, la composition en acides aminés essentiels ainsi que la composition en stérols totaux ($\mu\text{g}/\text{mg}$) sont visualisées à l'aide de représentations de type

positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS pour non Metric Multidimensional Scaling). Cette méthode d'ordination se base sur les matrices de distances de Bray-Curtis et permet de visualiser les différences entre les diètes dans un espace réduit à n dimensions. Dans un premier temps, le nombre de dimensions est déterminé suite à 10 itérations de la nMDS pour un nombre d'axes allant de 1 à 5 en appliquant la valeur seuil de 0.2 pour la *stress value*. Une fois ce nombre de dimensions établi, la nMDS est relancée avec 50 itérations afin de retenir la configuration qui minimise au mieux la valeur de la *stress value* dans l'espace aux dimensions retenues. Sur le graphique obtenu, chaque diète est représentée par un symbole unique. Plus les points sont proches, plus la composition chimique (i.e. acides aminés essentiels ou stérols) qui les caractérise est similaire et inversement.

Afin de détecter une éventuelle différence significative entre les diètes sur base de leur composition chimique, une analyse multivariée de la variance par permutation (perMANOVA) est effectuée sur les données visualisées sur la nMDS. Il s'agit d'une MANOVA réalisée par le biais de tests de permutation, ce qui la rend robuste à la non-normalité des données. Seule l'égalité des matrices de variance/covariance doit être rencontrée (fonction "betadisper"). Tout comme la nMDS, la perMANOVA est effectuée sur une matrice de dissimilarité de Bray-Curtis et utilise 999 permutations. L'analyse retourne une *p-value* permettant d'établir si il y a une différence significative entre les diètes sur base de leurs compositions chimiques.

Une analyse en composant principal est employée pour détecter les composants indicateurs de chaque matrice. Ce test est généralement utilisé en biologie pour des données d'espèces mais la forme des jeux de données permet de l'utiliser également dans le cadre de composés chimiques. Une valeur indicatrice est calculée à partir de la fréquence et de l'abondance relative de chaque composé stérolique pour déterminer celui possédant la meilleure capacité indicatrice. Une *p-value* est calculée pour chaque combinaison de données pour un échantillon afin de déterminer lesquelles de ces données sont caractéristique de l'échantillon. La correction de Holm est utilisée sur la *p-value* afin de limiter le risque d'erreur dû à des tests multiples.

4. Résultats

4.1.Élevages

Les résultats obtenus par le calcul de l'efficacité des diètes et de la digestibilité des grains sont présentés ici sous forme de boîtes de dispersion (figure 16 et 17). Les colonies ont consommé des volumes similaires de biogluk, cette donnée ne sera donc pas abordée.

4.1.1. Efficacité des diètes

L'efficacité des diètes est significativement influencée par le pollen la composant. Les diètes à base de *Trifolium repens* ou *Salix caprea* sont significativement plus efficaces que celles de *Cistus* sp. Aucune différence significative n'est mesurée entre les différentes fractions de *Trifolium repens* et les diètes pures de *Salix capreas* ou de *Rubus* sp. Qui plus est, il n'est pas non plus possible de différencier significativement la diète de *Rubus* sp. de celle de *Cistus* sp.

Trifolium repens possède un pollen fournissant une diète de bonne efficacité, car elle est comparable à celle du témoin positif. Une diète à base de pollen de *Rubus* sp. est, elle, comparable à la fois au témoin positif et négatif. Cette diète semble donc moins performante.

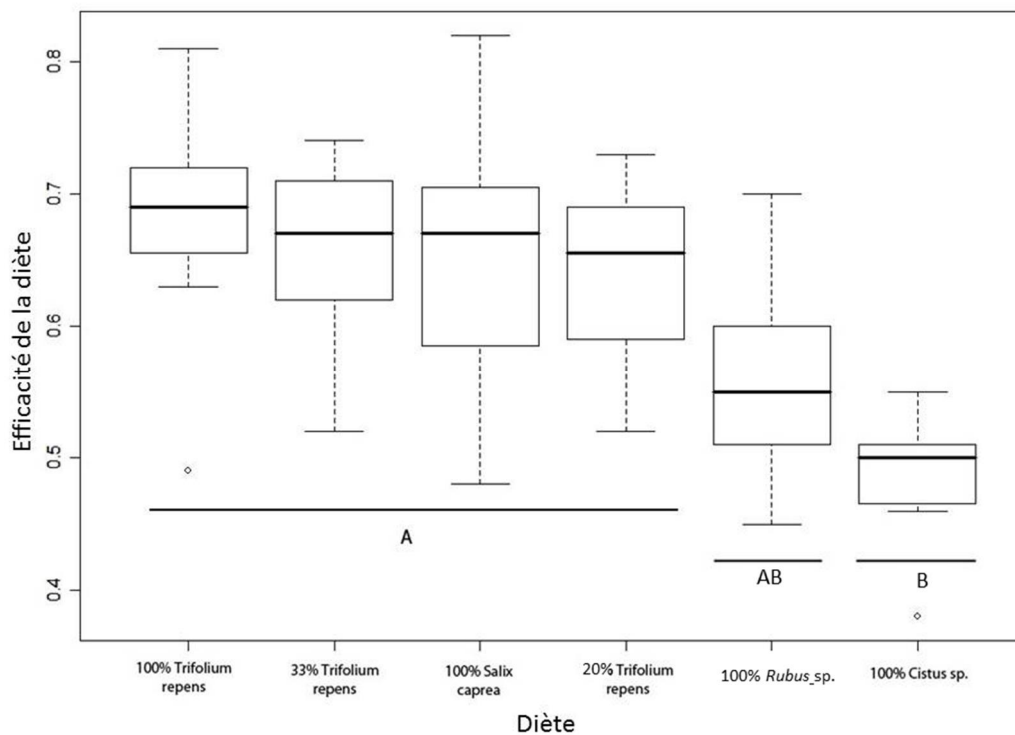


Figure 16: Résultats de l'efficacité de la diète suivant sa composition.

4.1.2. Digestibilité du pollen

Ni la digestibilité de *Calluna vulgaris* ni celle de *Rubus* sp. ne sont significativement différentes de celle de *Cistus* sp. (témoin négatif). Néanmoins, la digestibilité de *Calluna vulgaris* est significativement moins bonne que celle de *Rubus* sp. Toujours d'un point de vue digestibilité, le pollen de *Trifolium repens* est significativement proche de celui de *Salix caprea* (témoin positif) et différent des trois autres.

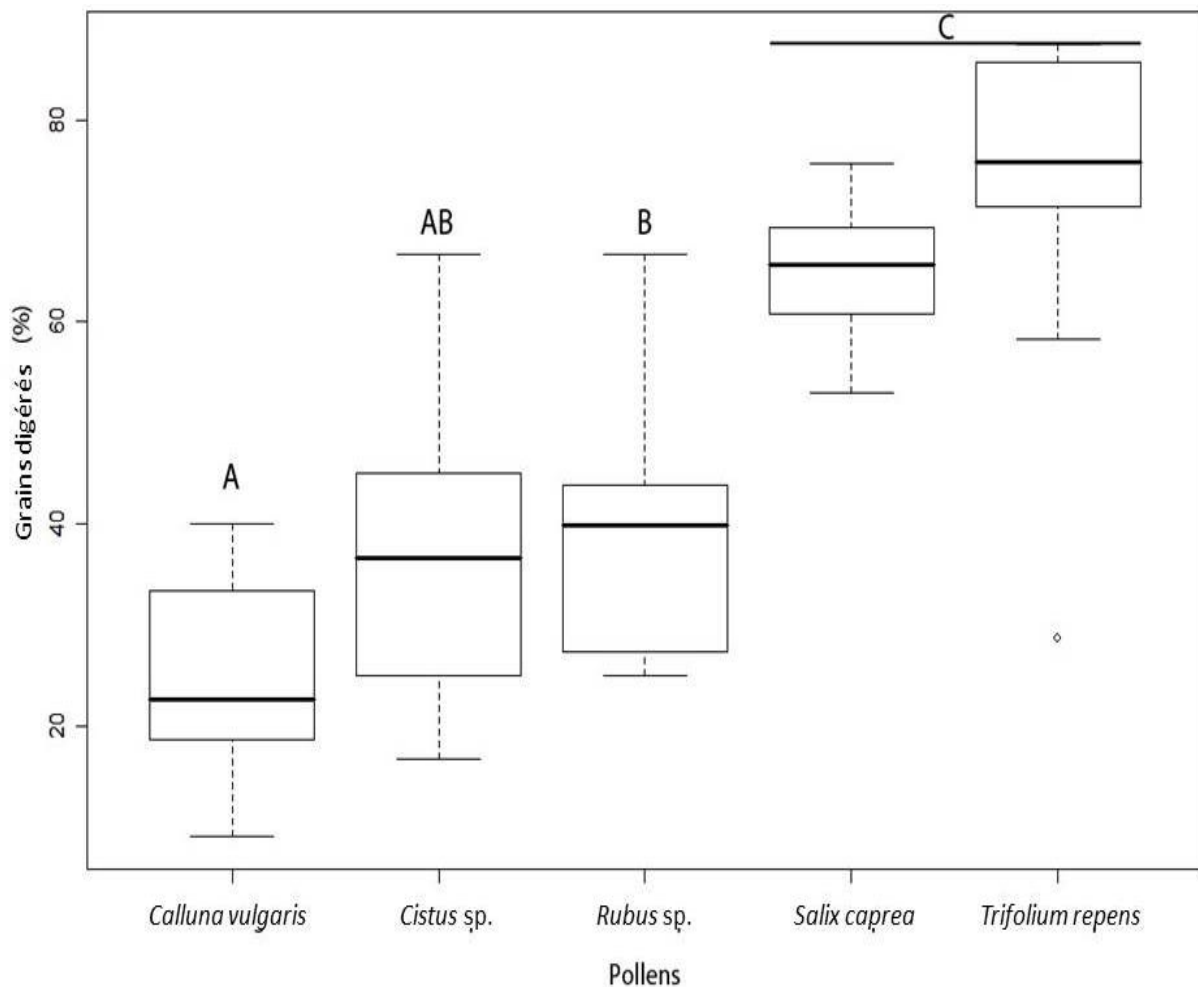


Figure 17: Digestibilités des pollens, mesurées sur les diètes pures

Ce graphique met en évidence la meilleure digestibilité du *Trifolium repens* parmi les trois types de pollen testés.

4.2. Comparaisons des compositions chimiques des plantes sources

4.2.1. Acides aminés

4.2.1.1. Acides aminés totaux

La quantité totale d'acides aminés retrouvés varie significativement en fonction du type de pollen étudié. Le pollen de *Calluna vulgaris* est significativement moins riche en acides aminés que les pollens de *Rubus* sp. ou de *Trifolium repens*. Et bien que le pollen de *Trifolium repens* semble plus riche en acides aminés que le pollen de *Rubus* sp., la différence entre les deux compositions n'est pas significative.

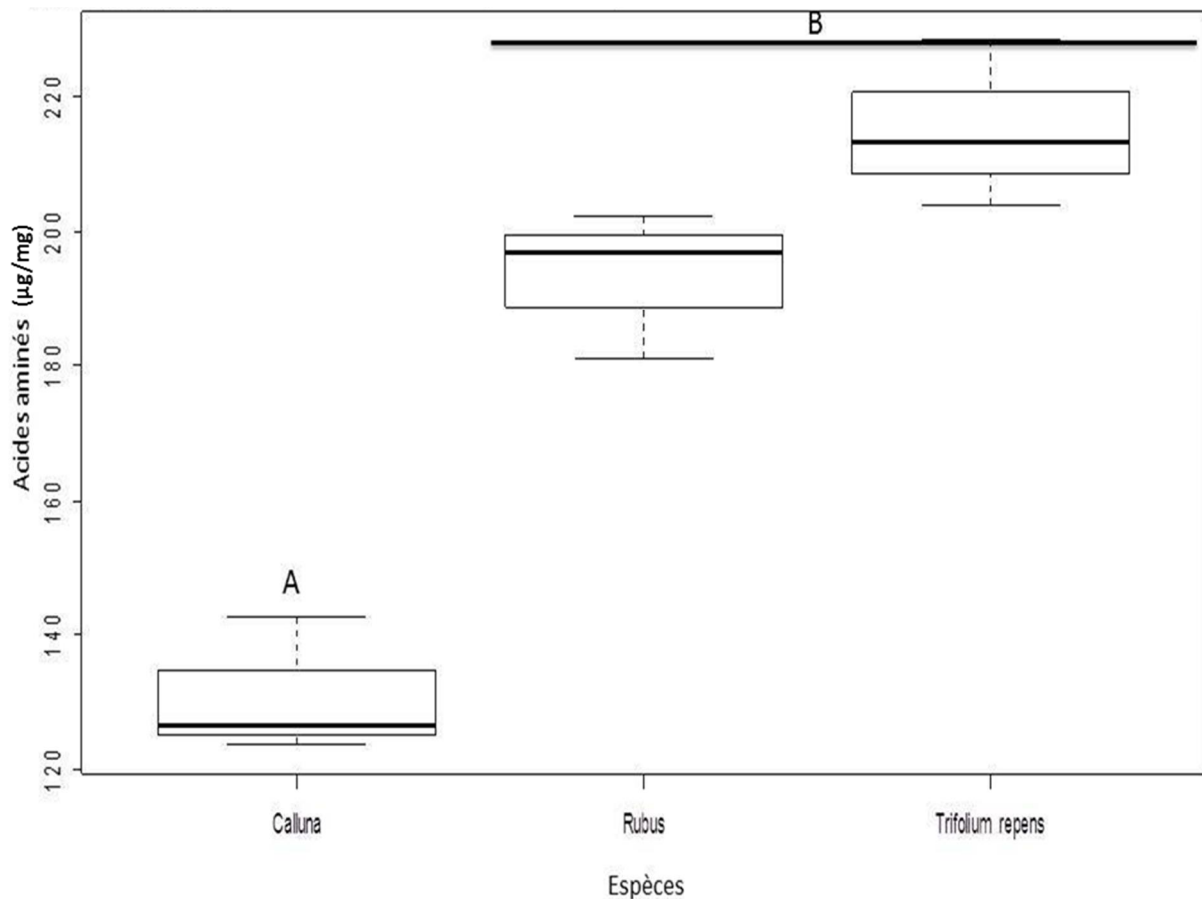


Figure 18: Comparaison de la quantité totale d'acides aminés (µg/mg) pour les trois types de pollen étudiés

4.2.1.2. Aspartate et glutamate

Le pollen de *Calluna vulgaris* est significativement moins riche en aspartate et glutamate que ceux de *Rubus* sp. et de *Trifolium repens*. À nouveau, la composition des pollens de *Rubus* sp. et de *Trifolium repens* sont similaires.

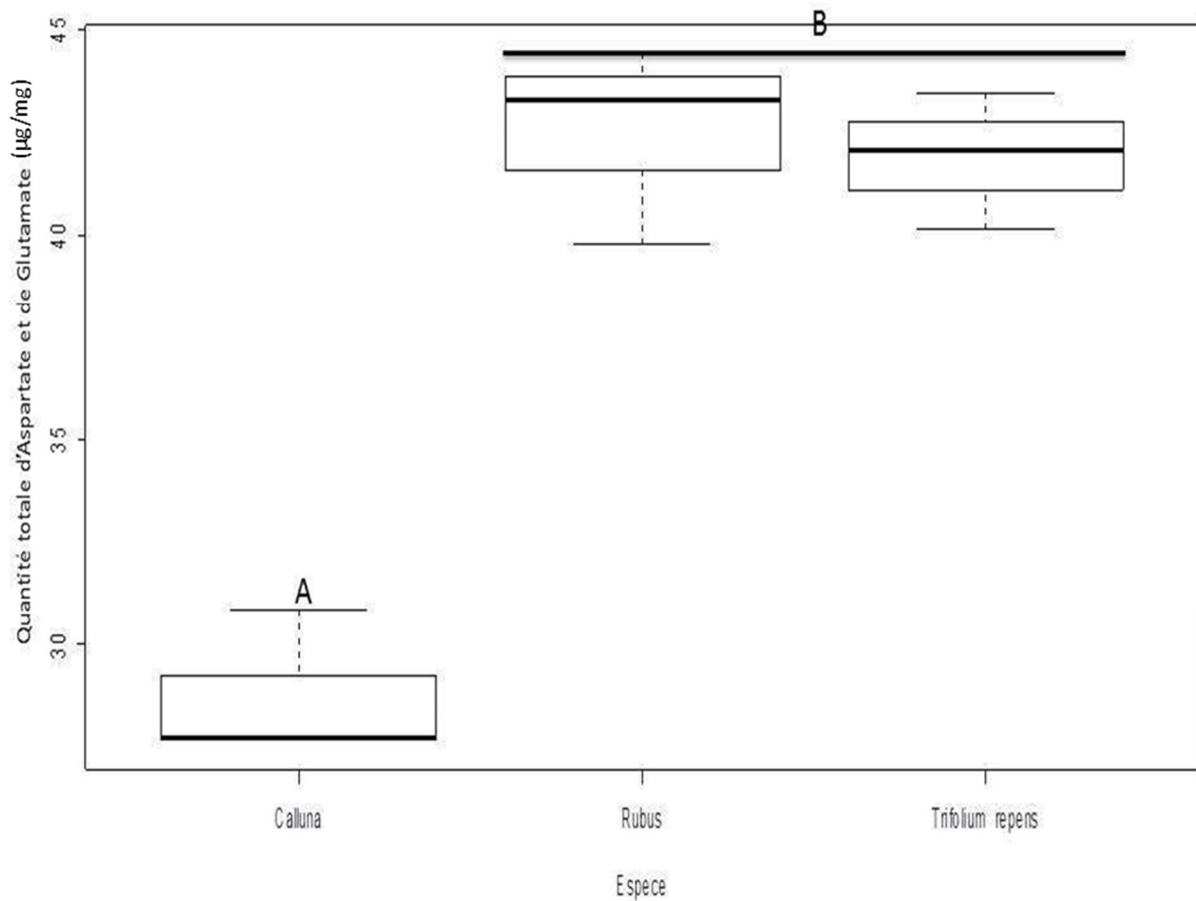


Figure 19: Comparaison de la quantité totale d'aspartate et de glutamate (µg/mg) pour les trois types de pollen étudiés

4.2.1.3. Proline

Le pollen de *Trifolium repens* est significativement plus riche en proline que ceux de *Calluna vulgaris* et de *Rubus* sp. Aucune différence significative n'est détectée entre le pollen de *Calluna vulgaris* et de *Rubus* sp.

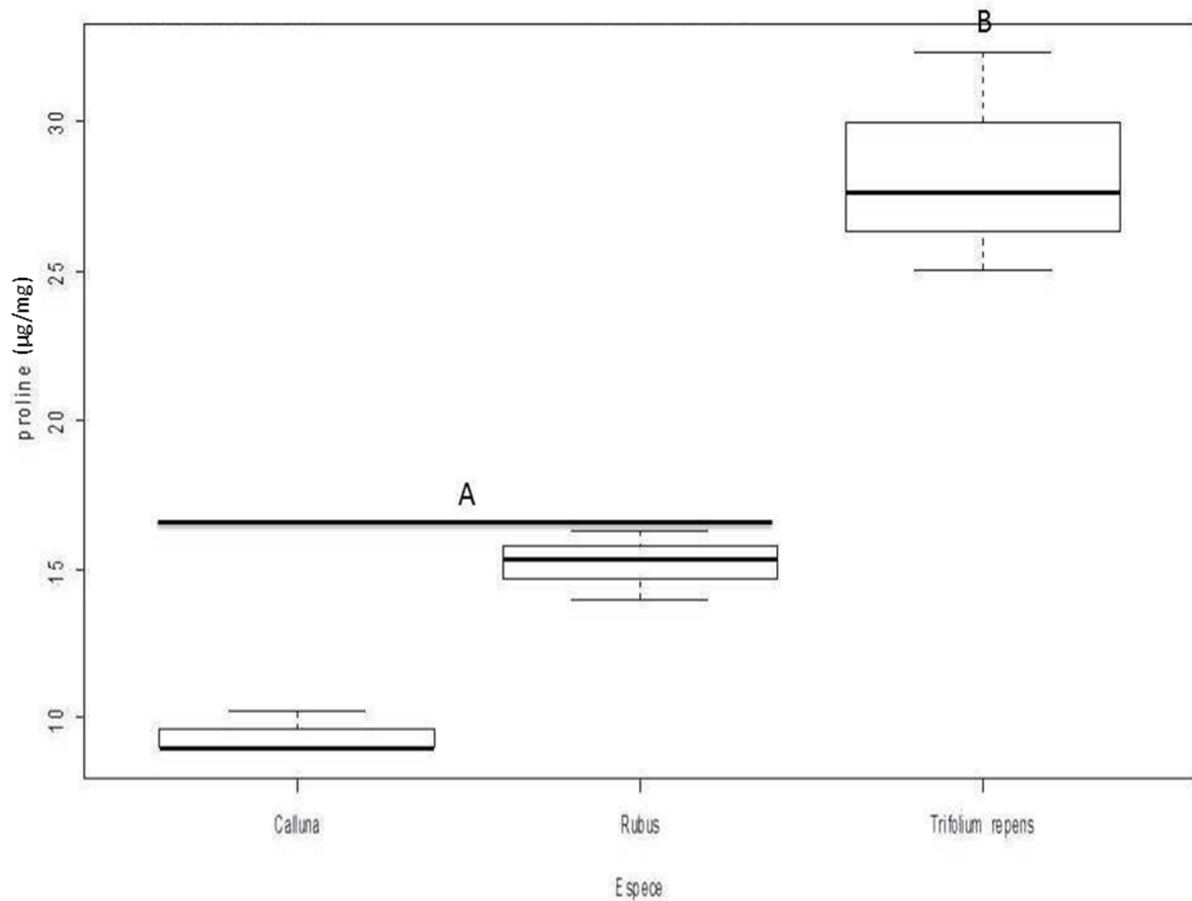


Figure 20: Comparaison de la quantité totale de proline (µg/mg) pour les trois types de pollen étudiés

4.2.1.4. Acides aminés essentiels

Le graphique NMDS des différents types de pollen en fonction des acides aminés essentiels permet de voir un regroupement des échantillons analysés en fonction du pollen source.

Les échantillons en provenance de *Trifolium repens* (vert) se répartissent en suivant l'axe indicateur de l'arginine et de la phénylalanine. *Rubus* sp. (rouge) est lui plutôt caractérisé par la leucine et la phénylalanine. Le pollen de *Calluna vulgaris* (bleu) n'a aucun composé indicateur en commun avec les deux autres types de pollens. Il s'agit d'un pollen dont les acides aminés essentiels caractéristiques sont l'isoleucine et la thréonine.

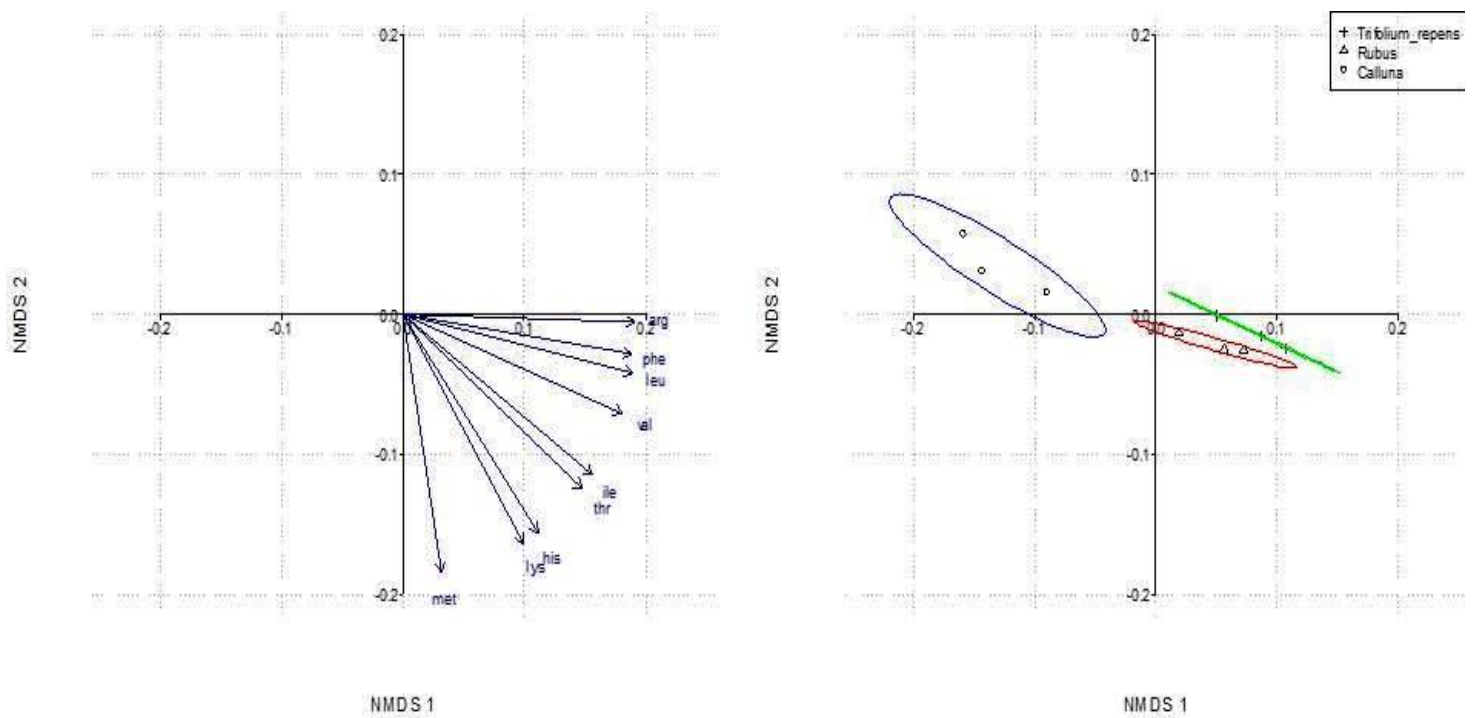


Figure 21: Détermination des acides aminés essentiels caractéristiques de chacun des trois types de pollen utilisés (*Trifolium repens*: vert; *Rubus* sp.: rouge; *Calluna vulgaris*: bleu)

4.2.2. Polypeptides totaux

Le pollen de *Calluna vulgaris* contient significativement moins de polypeptides que les pollens de *Trifolium repens* ou de *Rubus* sp. Il n'y a pas de différence significative entre les compositions des pollens de *Trifolium repens* et de *Rubus* sp.

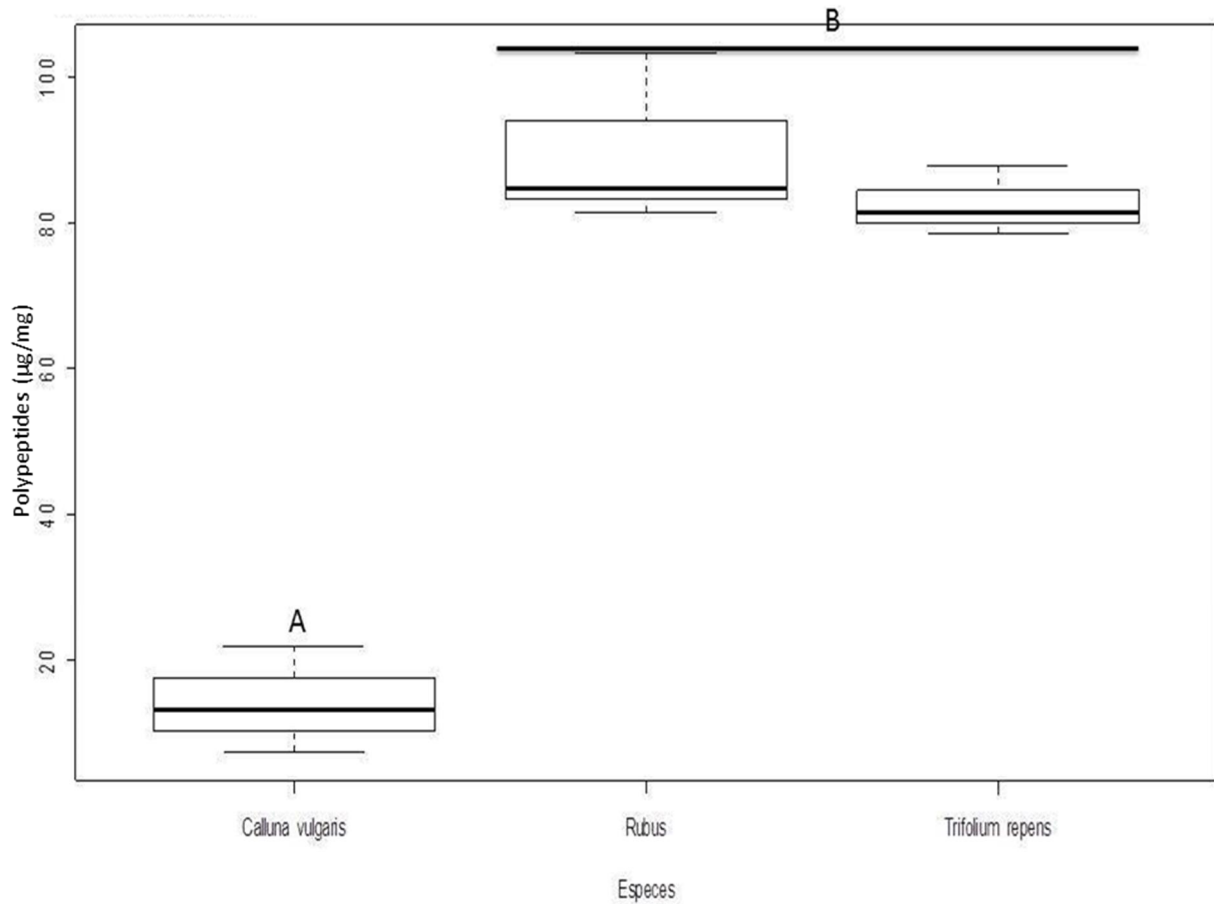


Figure 22: Comparaison de la quantité totale de polypeptides (µg/mg) pour les trois types de pollen étudiés

4.2.3. Stérols

4.2.3.1. Analyse des chromatogrammes

Trois chromatogrammes sont obtenus pour chaque source de pollen, mais un seul n'est montré à chaque fois comme exemple.

L'analyse du chromatogramme des stérols de *Trifolium repens* met en évidence cinq stérols majoritaires (dont la fraction est supérieure à 5% des stérols totaux), étant par ordre d'importance: la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol, le D5-avenastérol, le sitostérol, le cholestérol et le 7-stigmastérol.

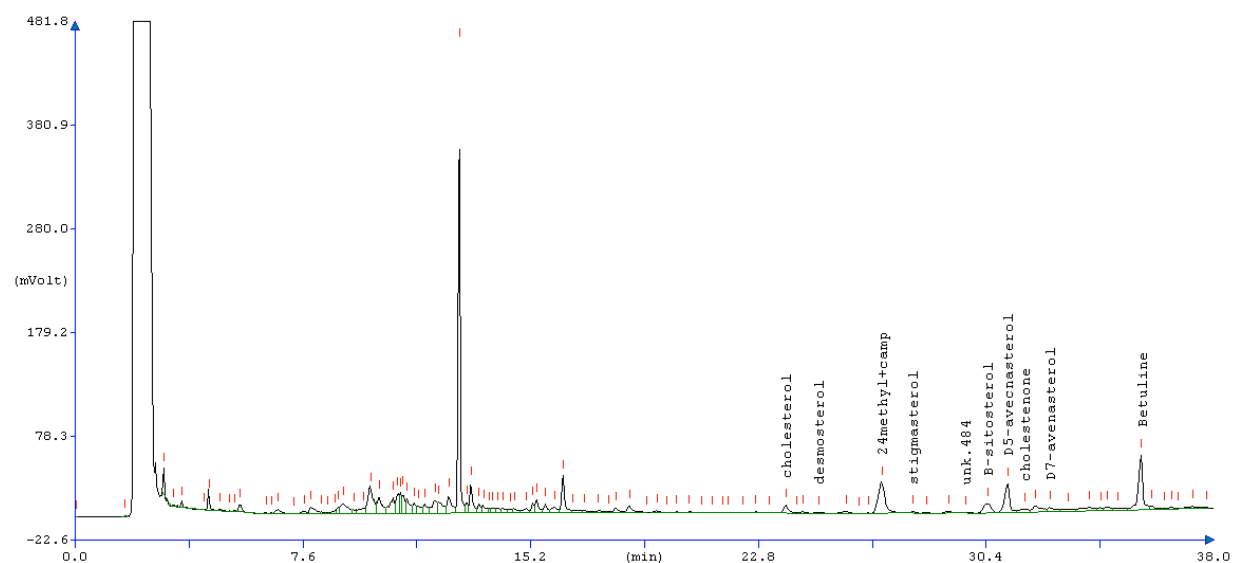


Figure 23: Chromatogramme des stérols en provenance d'un échantillon de *Trifolium repens* collecté par *Apis mellifera*

En comparaison, les cinq stérols majoritaires retrouvés dans les analyses de *Rubus* sp. sont, par ordre d'importance: la fraction 24-méthylènecholestérol / campestérol, le cholestérol, le Δ^5 -sitostérol, le D5-avenastérol et le Δ^7 -avenastérol.

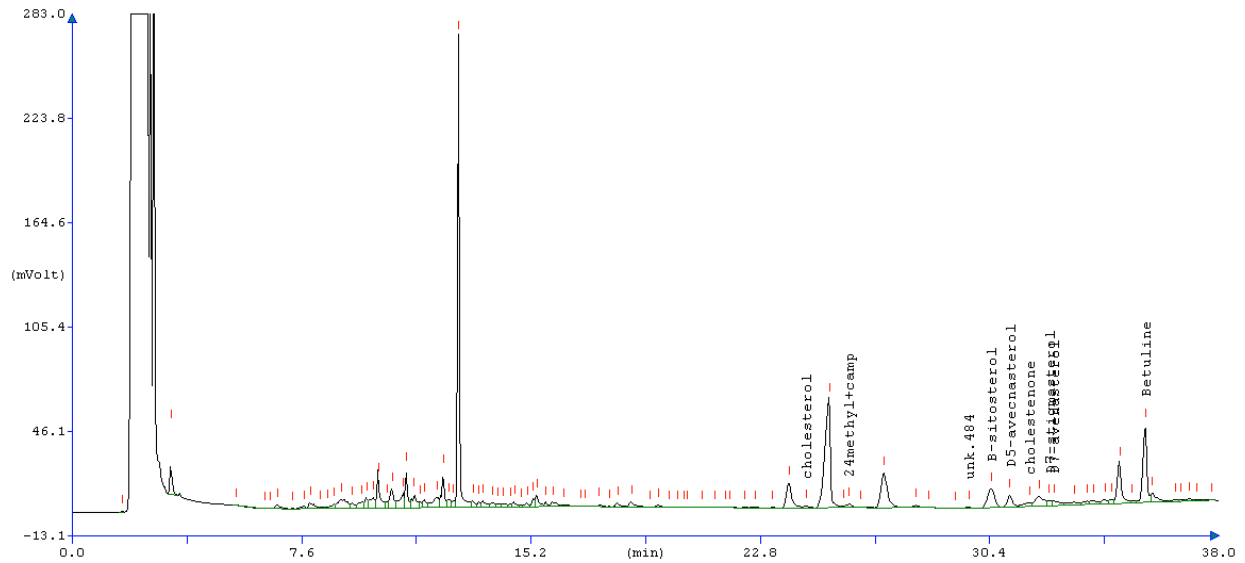


Figure 24: Chromatogramme des stérols en provenance d'un échantillon de *Rubus* sp. collecté par *Apis mellifera*

Enfin, l'analyse du chromatogramme obtenu avec le pollen de *Calluna vulgaris* a mis en évidence quatre composés majoritaires, étant: le D5-avenastérol, le Δ^5 -sitostérol, le Δ^7 -avenastérol et le Δ^7 -stigmastérol.

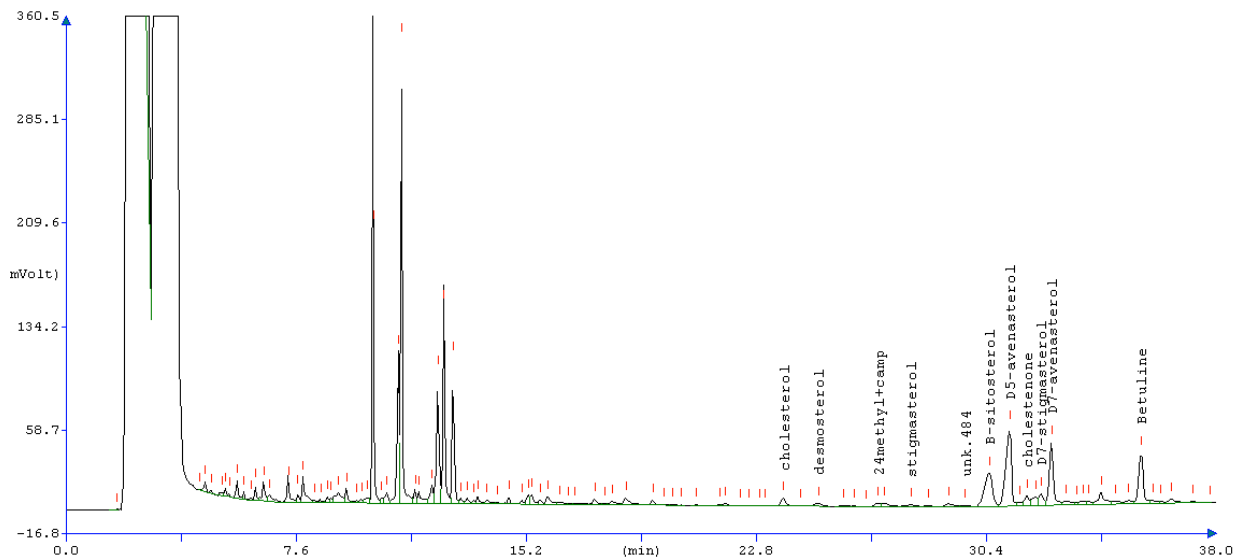


Figure 25: Chromatogramme des stérols en provenance d'un échantillon de *Calluna vulgaris* collecté par *Apis mellifera*

Tableau 9 : Récapitulatif des analyses de la composition stérolique associées aux chromatogrammes de *Trifolium repens*, *Rubus* sp. et de *Calluna vulgaris* montrés ci-dessus. Les stérols comparés sont les dix observables entre les pics du cholestérol et de la bétuline. Les nombres indiqués représentent la valeur moyenne obtenue du pourcentage de la fraction stérolique totale. Les stérols marqués en gras sont les stérols majoritairement représentés dans l'échantillon (ceux dont la fraction représentée est supérieur à 5% de la quantité stérolique totale). La valeur INC représente un stérol dont la concentration est inférieure au seuil de détection du GC-FID.

Composé\Plante source	<i>Trifolium repens</i>	<i>Rubus</i> sp.	<i>Calluna vulgaris</i>
Cholestérol	16.98 ± 10.91	12.32 ± 7.50	2.77 ± 0.87
Desmostérol	1.07 ± 0.07	INC	1.63 ± 0.20
24-méthylène cholestérol + Campesterol	29.54 ± 7.82	53.20 ± 26.10	1.44 ± 0.06
Stigmastérol	1.41 ± 0.40	1.27 ± 0.60	0.89 ± 0.19
Δ ⁵ -avenastérol	21.71 ± 4.17	8.77 ± 4.67	35.44 ± 0.93
Cholesténone	3.48 ± 1.99	3.59 ± 2.60	3.91 ± 0.26
Δ ⁷ -stigmastérol	11.84 ± 5.69	1.27 ± 1.19	5.45 ± 0.48
Δ ⁷ -avenastérol	3.98 ± 1.61	6.13 ± 2.83	23.98 ± 2.24
Stigmasterol	9.98 ± 2.50	13.43 ± 9.51	24.47 ± 0.52

4.2.3.2. Stérols totaux

Les données des concentrations totales des stérols n'ont pas une distribution normale, même après transformation logarithmique. Un test de Kruskal-Wallis est donc employé après le boxplott pour déterminer s'il existe une différence significative entre la composition des différents pollens utilisés.

Il n'est pas possible de différencier les différents pollens étudiés en fonction de leurs stérols totaux.

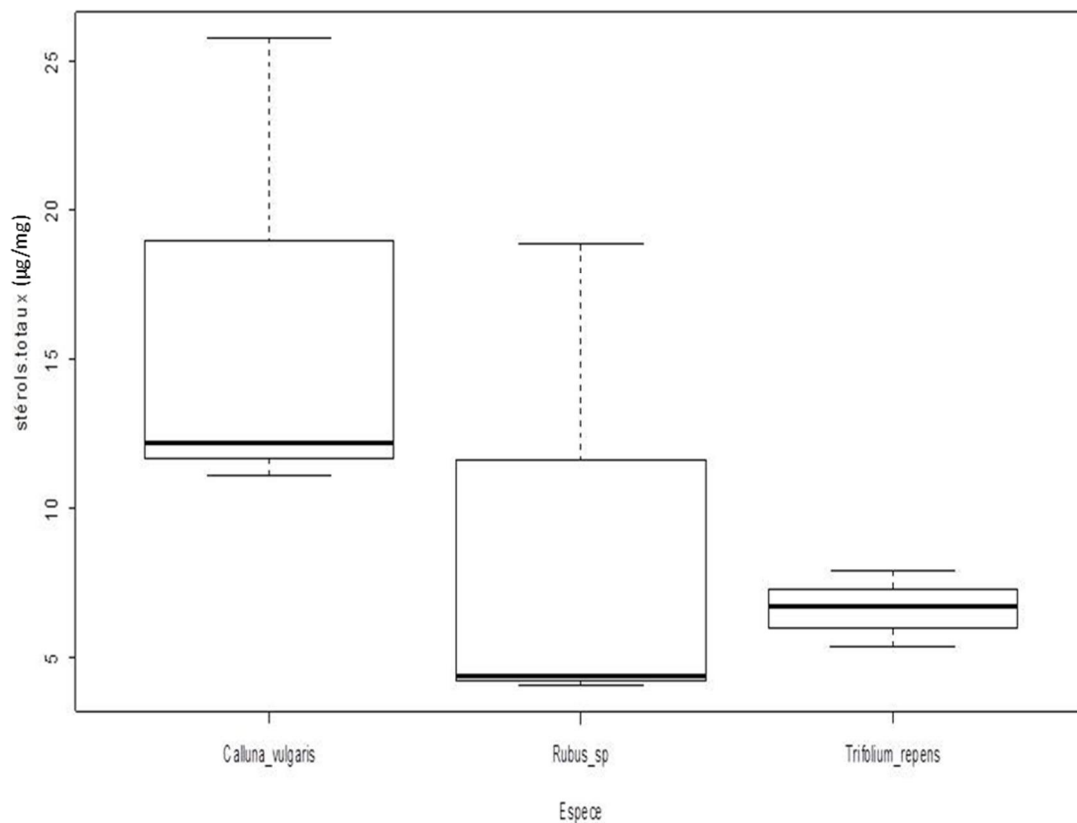


Figure 26: Comparaison de la quantité totale de stérols (µg/mg) pour les trois types de pollen étudiés

4.2.3.3. Composés stéroliques

Les échantillons de pollens de *Trifolium repens* (vert) sont bien regroupés en un groupe caractérisé par le cholestérol. Deux échantillons du groupe de *Rubus* sp. (rouge) sont également caractérisés par le cholestérol, tandis que le troisième à le 24 méthylcholestérol / campestérol comme composant caractéristique. Le groupe du pollen de *Calluna vulgaris* (bleu) est réparti sur les sept autres axes, c'est-à-dire desmostérol, stigmastérol, D5-avenastérol, cholesténone, 7-stigmastérol, 7-avenastérol et sitostérol.

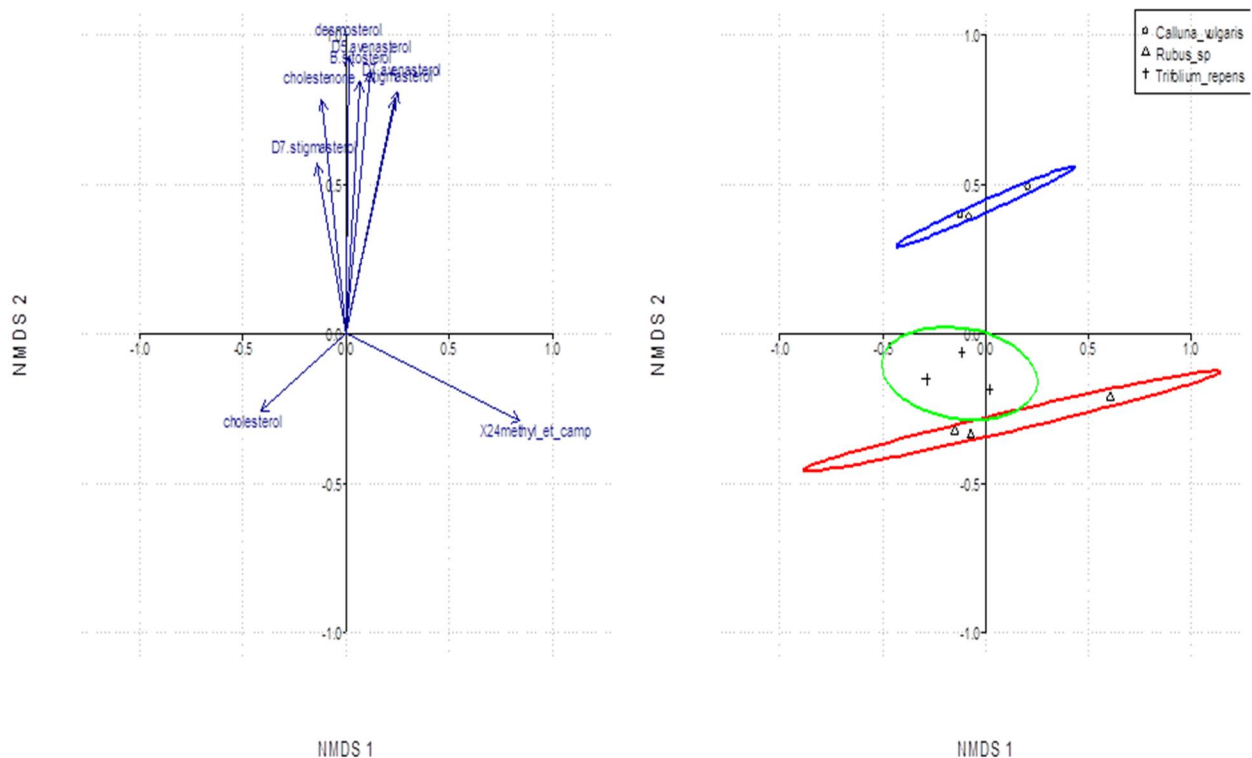


Figure 27: Détermination des stérols caractéristiques de chacun des trois types de pollen utilisés (*Trifolium repens*: vert; *Rubus* sp.: rouge; *Calluna vulgaris*: bleu)

5. Discussion

5.1. Efficacité de la diète en pollen de *Rubus* sp. pour *Bombus terrestris*.

Différentes études, comme celle de Génissel *et al.* (2002) ont déjà démontré que la source de pollen influe sur la santé et le développement des micro-colonies.

Le pollen est la seule source de polypeptides pour les bourdons et ceux-ci en ont besoin pour les développements larvaires (Carvell *et al.*, 2006 ; Tasei & Aupinel, 2008). Une concentration élevée en polypeptides est généralement associée au bon développement des organes sexuels et des glandes hypopharyngiales et sexuelles des adulte, (Tasei & Aupinel, 2008).

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons pu mettre en évidence que la concentration en polypeptide de *Rubus* sp. est aussi importante que celle de *Trifolium repens*. En comparant nos résultats à ceux de Tasei et Opinel (2008), la concentration en polypeptide de *Rubus* sp. est inférieure à celle mesurée sur leurs bonnes diètes que sont les pollens de *Papaver* et de *Castanea*.

Néanmoins, en comparant la concentration en polypeptides de *Rubus* sp. obtenue à celle trouvée par Tasei et Opinel (2008), nos résultats indiquent une concentration inférieure à la leur. Cette variation pourrait être due à la différence de méthode d'extraction employée, à l'origine du *Rubus* sp. analysé, ou à une variation intraspécifique des concentrations en nutriments.

En comparant nos résultats à diverses observations de Vanderplanck *et al.* (2013), il est à noter la plus haute concentration en polypeptide d'une diète de pollen de *Rubus* sp. pur par rapport à une diète de pollen de *Salix caprea* pur.

En plus de la concentration en polypeptide, celle des acides aminés est également importante dans la détermination d'un pollen fournissant une bonne diète. En effet, un pollen de bonne qualité contient une grande quantité d'acides aminés essentiels (Cook *et al.*, 2003).

À nouveau, les résultats des tests comparatifs des concentrations en acides aminés indiquent la bonne qualité nutritionnelle de *Rubus* sp. Parmi ces acides aminés, les hautes concentrations en aspartate et en glutamate démontrent un taux d'azote suffisant au développement et à la bonne santé des larves. Cette composition en azote est un autre des paramètres significatifs de la valeur nutritive des diètes (Tasei & Aupinel, 2008). Il est également intéressant de noter que si la teneur en acides aminés du pollen de *Rubus* sp. est plus faible que celle de *Symphytum officinalis* autrefois fortement consommée, elle est néanmoins comparable à celle de la Fabaceae *Lotus cornicularis* et de *Papaver rhoeas*, toutes deux consommées avant 1950 et encore de nos jours (Weiner *et al.* 2010; Klein & Raemakers,

2008). Enfin, la concentration en acides aminés de *Rubus* sp. est également similaire à celle du pollen de Salicaceae (Weiner *et al.*, 2010).

La répartition des acides aminés essentiels indicateurs de *Rubus* sp. est également proche de celle de *Trifolium repens*, ce qui répond au critère découvert par Cook *et al.* (2003). Qui plus est, comme expliqué par Chapman (2012), le ratio des acides aminés essentiels par rapport aux acides aminés totaux est proche de 1 :1. Ce ratio est comparable à celui de la plante exotique envahissante *Impatiens glandulifera* également fortement retrouvée dans les nouvelles diètes, et de *Salix* sp. (Weiner *et al.*, 2010). C'est un résultat bien meilleur que celui retrouvé pour de nombreux pollen de plantes toujours visitées, comme *Echium vulgare*, *Lotus cornicularis*, ou *Papaver rhoeas*. Il est également meilleur que celui du pollen de *Symphytum officinalis* autrefois visitée (Weiner *et al.*, 2010).

Un autre acide aminé important est la proline qui est utilisée lors du vol (Micheu *et al.*, 2000). Les analyses réalisées ici montrent sa plus faible concentration dans le pollen de *Rubus* sp. par rapport au pollen de *Trifolium repens*. Très peu de recherches publiées ont actuellement été effectuée sur la concentration en proline dans le pollen, et la seule donnant des valeurs en unités relative est celle de Weiner *et al.* (2010). Il s'agit des valeurs de concentration en proline obtenues pour le pollen de *Campanula trachelium*, et d'*Agrimonia eupatoria* (28.78 µg/mg). Cette valeur est meilleure que celle obtenue pour *Rubus* sp. *Campanula* sp. était fortement consommée avant 1950 par certaines espèces actuellement en déclin comme *Bombus jonellus* ou *Bombus soroeensis*. Par contre, aucune information quant au degré d'utilisation d'*Agrimonia eupatoria* par les bourdons lors de leur récolte de pollen n'a été trouvée dans la littérature.

Cette diminution n'induit pas de conséquence sur le développement larvaire dans le cadre d'une étude sur des micro-colonies élevées dans le noir, car ceux-ci sont incapables de voir et donc de voler dans ces conditions. Néanmoins, cette différence pourrait avoir un impact sur le développement d'une colonie de bourdon *in natura*.

Les stérols sont également des composés ne se retrouvant que dans le pollen, et indispensable au développement des larves (Chapman, 2012). Il est donc probablement important que le pollen de *Rubus* sp. contienne du 24-méthylène cholestérol car il est précurseur de la makistérone A (hormone de mue). Ici, la fraction 24-méthylène cholestérol/campestérol fait partie des composés majoritaires des stérols retrouvés dans le pollen de *Rubus* sp.

Parmi les autres stérols majoritaires retrouvés dans le pollen de *Rubus* sp., la concentration en 7-stigmastérol est moins importante que dans le cas du pollen de *Trifolium repens*, tandis que le 7-avenastérol est en plus haute concentration. Aucune information sur ces deux stérols n'ayant été trouvée dans la littérature, l'effet du remplacement de l'un par l'autre dans le développement des micro-colonies ne peut être déterminé.

Le cholestérol, le 5-avenastérol et le sitostérol sont tous les trois des composés majoritaires retrouvés dans les pollens de *Rubus* sp. et de *Trifolium repens*. Si l'effet de la

présence de cholestérol et de 5-avenastérol n'a pas encore été étudié, nous savons que la présence de sitostérol dans une diète n'intervient pas sur l'efficacité de celle-ci (Regali, 1995).

La digestibilité de *Rubus* sp. étant moins bonne que celle de *Trifolium repens*, l'accessibilité des nutriments, et donc l'efficacité de la diète de *Rubus* sp. diminue par rapport à celle de *Trifolium repens*. Cette diminution d'efficacité est observable dans les résultats de digestibilité des diètes, bien que non significative. Très peu d'études connues ont été réalisées sur la digestibilité de différents pollens. Parmi ceux-ci, tous ceux repris par Roulston & Cane (2000) ne parlent que de la capacité générale de digestion, sans se focaliser sur une espèce florale à la fois. Qui plus est, aucun d'entre eux ne parle de la digestion du pollen par *Bombus terrestris*. Ce manque d'information ne permet donc pas de comparer la digestibilité de *Rubus* sp. avec celle d'autres espèces à forte consommation.

Les tests d'élevage confirment la bonne valeur nutritionnelle potentielle de *Rubus* sp. basée sur les analyses chimiques, confirmant les résultats obtenus par Tasei & Aupinel (2008).

5.2. Choix floraux des bourdons

Leonhards et Blüthgen (2012) ont mis en évidence la capacité des bourdons à estimer la qualité nutritive d'un type de pollen. Ils peuvent évaluer la quantité de polypeptide et d'acides aminés hydrosolubles que contient un pollen, ce qui est un excellent indicateur de la quantité totale d'acide aminé qu'il contient. D'après ces résultats, et en comparant ceux obtenus dans le cadre de ce mémoire, les similitudes de concentrations en acides aminés et en polypeptides entre *Rubus* sp. et *Trifolium repens* pourrait avoir facilité la transition d'une ressource à l'autre.

Debaille (1995) a mis en évidence l'attrait qu'exerce le sitostérol sur les bourdons. En effet, dans le cas d'une compétition avec *Apis mellifera* pour les ressources disponibles, le sitostérol agit comme un répulsif à l'égard de ces dernières, tandis que les *Bombus terrestris* intensifient leurs collectes sur les plantes possédant une haute concentration en ce composé. La proximité des concentrations en ce stérol de *Trifolium pratense* et de *Rubus* sp. pourrait donc avoir contribué à faciliter le passage d'une ressource à l'autre.

Debaille (1995) a également démontré l'attrait des bourdons pour les fleurs mauves ou bleues et à symétrie bilatérale. Si cet attrait est bien présent dans le cas de *Trifolium pratense* de par sa morphologie, aucune de ces caractéristiques n'incite à la collecte sur *Rubus* sp.

Grüter & Ratnieks (2011) notent que la fidélisation chez les *Bombus terrestris* est favorisée par la ressemblance de couleur et de physiologie entre les fleurs, et la distance les séparant. Ainsi, la facilité de changement de ressource sera plus importante sur des plantes géographiquement peu éloignées et dont la couleur est proche. Dans le cadre d'un

changement de diète de *Trifolium pratense* à *Rubus* sp. la proximité géographique des ressources est bel est bien observée, mais les ressemblances morphologiques sont absentes.

Nous pouvons donc en déduire que le passage d'une diète composée en majorité de *Trifolium pratense* à une diète composée principalement de *Rubus* sp est plus dû à un attrait chimique que morphologique.

5.3. Modifications de la diète de *Bombus terrestris*.

En comparant la concentration en polypeptide des pollens de *Trifolium repens* et de *Trifolium pratense* déterminée par Somme *et al.* (soumis), de grandes similitudes sont remarquées dans les concentrations en stérols, en acides aminés, et en acides aminés essentiels. Les résultats obtenus pour *Trifolium repens* peuvent donc être certainement extrapolés pour *Trifolium pratense*. Néanmoins, de futures analyses plus poussées pourraient être envisageables pour confirmer cette hypothèse.

En fonction des résultats des analyses obtenus pour la chimie des pollens de *Rubus* sp. et *Trifolium repens*, et les élevages sur ces deux diètes, nous pouvons affirmer que le changement de ressource des bourdons de *Trifolium pratense* vers *Rubus* sp. a pu favoriser le maintien des populations de *Bombus terrestris*.

Ces résultats peuvent être extrapolables aux autres espèces de bourdons à population stable, nous pouvons donc penser à juste titre que le passage de la diète ancestrale *Trifolium pratense* vers la diète actuelle *Rubus* sp. a pu être l'un des facteurs qui leur a permis de survivre. À l'inverse, nous pouvons faire l'hypothèse qu'une des causes du déclin de nombreuses espèces de bourdons comme *Bombus humilis*, *Bombus jonellus* ou encore *Bombus sylvarum* (Klein et Raemakers, 2008) serait une incapacité à remplacer une bonne ressource par une autre. Les données récoltées par Goulson & Darvill (2004) au sujet des différences de diète entre les espèces stables et en déclin vont dans ce sens. En effet, ceux-ci ont observé le plus vaste choix alimentaire des espèces stables par rapport aux espèces déclinantes. Les espèces de bourdons en déclin sont donc bien plus attachées à leurs habitudes alimentaires que les espèces stables, ce qui les empêche de compléter ou de remplacer une source de nourriture déclinante par une autre de qualité comparable. Ceci explique également la meilleure survie des bourdons généralistes, capables de passer d'une diète à une autre, équivalente en termes chimiques et alimentaires.

Tasei et Aupinel (2008) ont émis l'hypothèse qu'une diète constituées d'un mélange de pollen est meilleur qu'une diète pure. Les résultats d'élevage réalisés dans le cadre de ce mémoire n'ont pas permis de retrouver cet effet de renforcement chez *Bombus terrestris*.

6. Conclusion

Nous avons pu mettre en évidence la similarité de concentration en polypeptides entre une diète ancestrale et une diète actuelle de *Bombus terrestris*. Ceci va dans le sens de l'hypothèse d'une capacité d'estimation de la concentration en polypeptide du pollen par les bourdons influençant son choix floral.

Nous avons également pu confirmer la concentration élevée en acides aminés du pollen de *Rubus* sp. avec un taux d'acides aminés essentiels comparable à celui de pollens actuellement considérés comme de bonne qualité pour le développement d'une colonie.

Nous avons pu mettre en avant un déroulement correct du développement des larves nourries au pollen de *Rubus* sp. Cela est probablement dû à sa bonne concentration en 24-méthylène cholestérol ainsi qu'à sa haute teneur en polypeptides.

La différence majeure remarquée entre le pollen de *Trifolium pratense* et celui de *Rubus* sp. est la moins bonne digestibilité du pollen de ronce.

En conclusion, si les bourdons ont la capacité de détecter la valeur nutritionnelle d'un pollen, la similarité chimique entre le pollen de ronce et celui de trèfle explique probablement les conditions qui ont permis le remplacement d'une ressource par une autre. D'autres facteurs interviennent probablement pour expliquer l'incapacité de certaines espèces à remplacer leurs ressources déclinantes par d'autres abondantes, ce qui favorise d'autant plus les espèces comme *Bombus terrestris* qui profite de son avantage pour s'étendre.

7. Perspectives

Si un long chemin a été parcouru dans le domaine de la connaissance des bourdons, de nombreuses questions restent en suspens.

Nous avons comparé dans ce mémoire l'effet d'une nouvelle diète en *Rubus* sp. à une diète ancestrale de *Trifolium pratense* sur des micro-colonies de *Bombus terrestris*. Il pourrait être intéressant d'étendre le champ de recherche en utilisant d'autres plantes de diète contemporaines comme *Echium vulgare*, *Impatiens glandulifera*, ou *Lythrum salicaria*. De même, il semblerait intéressant de vérifier ces diètes pour d'autres espèces de bourdons, notamment des espèces en déclin comme *Bombus sylvaris* ou *Bombus soroeensis*.

Toujours d'un point de vue chimique, il serait intéressant de comparer la teneur en polypeptides, acides aminés, et stérols contenus dans les tissus des bourdons élevés. Une comparaison de la taille des ovarioles de reines adultes en fonction de la nourriture fournie à la colonie mère est une autre manipulation qui pourrait être envisagée.

Les tests de ce présent mémoire ont été réalisés sur des diètes de *Trifolium repens* au lieu de *Trifolium pratense* sur base des observations d'une étude précédente (Roulston *et al.*, 2000). Une légère variation du contenu polypeptidique ayant été remarquée, une comparaison plus poussée de ces deux diètes, l'une étant ancestrale (*Trifolium pratense*) et l'autre contemporaine (*Trifolium repens*), pourrait s'avérer enrichissante.

Dans le cadre de manipulations de micro-colonies élevées dans le noir et étant fournie *ad libitum* en pollen, la concentration en proline n'a aucun effet sur le développement. Une manipulation envisageable pour mettre ce facteur en jeu serait d'utiliser des colonies ou des micro-colonies libres de voler et étant obligées d'aller elles même récolter leur pollen.

8. Bibliographie

- Alford, D.V. (1975). *Bumblebees*. London, Davis-Poynter. xii+352 p.
- Amiet, F. (1996). *Fauna Helvetica. Apidae 1 (Apis, Bombus und Psithyrus)*. Neuchatel, Schweizerische Entomologische Gesellschaft.
- Benton, T. (2006). *Bumblebees*. London, Collins.
- Carvell, C., Westrich, P., Meek, W. R., Pywell, R. F. and Nowakowski, M. (2006). *Assessing the value of annual and perennial forage mixtures for bumblebees by direct observation and pollen analysis*. *Apidologie* 37(3): 326-340.
- Chapman, R.F. (2012). *The insects structures and function 5th edition*. Cambridge, Massachusetts, Cambridge University press. 929 p.
- Cook, S. M., C. S. Awmack, et al. (2003). *Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition?* *Ecological Entomology* 28(5): 622-627.
- de Brito Sanchez, M. G. (2011). *Taste perception in honey bees*. *Chemical Senses* 36(8): 675-692.
- Debaille, F. (1995). *Partage des ressources polliniques entre abeille domestique (Apis mellifera) et bourdons (Bombus terrestris (L.)) en fonction de la présence ou de l'absence de β -sitostérol : mise au point d'une méthode expérimentale*. Mémoire de fin d'étude, Université de Mons, 68p.
- Edwards, M. and Williams, P.H. (2004). *Where have all the bumblebees gone, and could they ever return?* *Brit. Wildl. June*, 305-312
- Fernandes-Da-Silva, P. G. and J. E. Serrão (2000). *Nutritive value and apparent digestibility of bee-collected and bee-stored pollen in the stingless bee, Scaptotrigona postica Latr. (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)*. *Apidologie* 31(1): 39-45.
- Genissel, A., Aupinel, P., Bressac, C., Tasei, J. N. and Chevrier, C. (2002). *Influence of pollen origin on performance of Bombus terrestris micro-colonies*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104(2-3): 329-336.
- Goulson, D. (2003). *Bumblebees, their behaviour and ecology*. Oxford, England, Oxford University Press. 235 p.
- Goulson, D. (2010). *Bumblebees behavior, ecology, and conservation 2nd edition*. Oxford, England. Oxford university press, 317 p.
- Goulson, D. and B. Darvill (2004). *Niche overlap and diet breadth in bumblebees; are rare species more specialized in their choice of flowers?* *Apidologie* 35(1): 55-63.
- Goulson, D., Hanley, M.E., Darvill, B., Ellis, J.S. and Knight, M.E. (2005). *Causes of rarity in bumblebees*. *Biological Conservation* 122(1): 1-8.
- Grüter C. and Ratnieks F. L. W. (2011). *Flower constancy in insect pollinators. Adaptive foraging behavior or cognitive limitation?* *Communicative & Integrative Biology* 4:6, 633-636
- Heinrich, B. (1979). *Bumblebee Economics*. Cambridge, Massachusetts, and London, England, Harvard University Press. 245 p.

- Heinrich, B. (1983). *Insect foraging energetics*. Pages 187-214 in C. E. Jones and R. J. Little, editors. Handbook of experimental pollination biology. Scientific and American Editions, New York, New York, USA.
- Inoue M.N., Yokoyama J., Washitani I. (2008) *Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera: Apidae)*, J. Insect Conserv. 12, 135-146
- Ishii, H. S. (2005). *Analysis of bumblebee visitation sequences within single bouts: Implication of the overstrike effect on short-term memory*. Behavioral Ecology and Sociobiology 57(6): 599-610.
- Kleijn, D. and I. Raemakers (2008). *A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species*. Ecology 89(7): 1811-1823.
- Lambinon, J., Léon, D., Jacques, D., Geerinck, D., Lebeau, J., Shumacker, R. et Vannerom H. (2004). *Nouvelle flore de la Belgique, du Grand-Duché de Luxembourg, du nord de la France et des régions voisines, cinquième édition*. Éditions du patrimoine du Jardin botanique national de Belgique, Meise, Belgique. 1167 pages.
- Leonhardt, S. D., Nico Blüthgen, N. (2012). *The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies*. Apidologie 43: 449-464
- Løken, A. (1973). *Studies on Scandinavian Bumble Bees (Hymenoptera, Apidae)*. Norsk entomologisk Tidsskrift 20(1): 1-218.
- Matsumura C., Yokoyama J., Washitani I. (2004) *Invasion status and potential impacts of an invasive alien bumblebee, Bombus terrestris L. (Hymenoptera: Apidae) naturalized in southern Hokkaido, Japan*. Global Environ. Res. 8, 51-66
- Micheu, S., Crailsheim, K. and Leonhard B. (2000). *Importance of proline and other amino acids during honeybee flight (Apis mellifera carnica POLLMANN)*. Amino Acids (2000) 18: 157-175
- Moerman R.(2011) ; *Impact de la diversité des ressources alimentaires sur le développement de microcolonies de Bombus terrestris (L.)(Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'étude, Université de Mons, 88p.
- Moore, P. D., Webb, J. A. and Collinson, M. E. (1991). *Pollen Analysis Second Edition*. Oxford, England, Blackwell Scientific Publication. 216 p.
- Murray, T.E., Coffey, M.F., Kehoe, E. and Horgan, F.G. (2013). *Pathogen prevalence in commercially reared bumble bees and evidence of spillover in conspecific populations*. Biological Conservation 159: 269-276.
- Nagamitsu T., Kenta T., Inari N., Kato E., Hiura T. (2006) *Abundance, body size, and morphology of bumblebees in an area where an exotic species, Bombus terrestris, has colonized in Japan*. Ecol. Res. 22, 331-341
- Nicolson, S. W. (2011). *Bee food: The chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two*. African Zoology 46(2): 197-204.
- Parent, J., Feller-Demalsy, M.J. and Richard, P.J.H. (1990). *Les sources de pollen et de nectar dans la région de Rimouski, Quebec, Canada*. Apidologie 21(5): 431-445.
- Pelletier, L. and McNeil, J. N. (2004). *Do bumblebees always forage as much as they could?* Insectes sociaux 51: 271-274.

- Pirk, C. W. W., C. Boodhoo, *et al.* (2009). *The importance of protein type and protein to carbohydrate ratio for survival and ovarian activation of caged honeybees (Apis mellifera scutellata)*. Apidologie 41(1): 62-72.
- Potts, S. G., Biesmeijer, J. C., Bommarco, R., Felicioli, A., Fischer, M., Jokinen, P., Kleijn, D., Klein, A.-M., Kunin, W. E., Neumann, P., Penev, L., D. Petanidou, T., Rasmont, P., Roberts, S. P. M., Smith, H. G., Sorensen, P. B., Steffan-Dewenter, I., Vaissière, B. E., Vilá, M., Vujic, A., Woyciechowski, M., Zobel, M., Settele, J. and Schweiger, O. (2011). *Developing European conservation and mitigation tools for pollination services: approaches of the STEP (Status and Trend of European Pollinators) project*. Journal of Apicultural Research 50(2): 152-164.
- Pouvreau, A. (2004). *Les insectes pollinisateurs*. Paris, France, Delachaux et Niestlé. 189 p.
- Rasmont, P., Pauly, A., Terzo, M., Patiny, S., Michez, D., Iserbyt, S., Barbier, Y. and Haubruge, E. (2005). *The survey of wild bees (Hymenoptera, Apoidea) in Belgium and France*. Mons, FAO: 18.
- Rasmont, P., Coppée, A., Michez, D. and De Meulemeester, T. (2008). *An overview of the Bombus terrestris (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae)*. Annales de la Société Entomologique de France 44(2): 243-250.
- Regali A. (1995). *Contribution à l'étude des besoins alimentaires en stéroïdes de Bombus terrestris (L.)*. Thèse de doctorat, Université de Mons-Hainaut, Mons, 144+29p.
- Roulston, T. H. and J. H. Cane (2000). *Pollen nutritional content and digestibility for animals*. Plant systematics and Evolution 222: 187-209.
- Roulston, T. H., Cane, J. H. and Buchmann, S. L. (2000). *What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen-pistil Interactions, or phylogeny?* Ecological Monographs 70(4): 617-643.
- Royer, C., Porcheron, P., Pradelles, P., Kerhoas, L., Einhorn, J. and Mauchamp, B. (1995). *Rapid and specific enzyme immunoassay for makisterone A.* Insect Biochemistry and Molecular Biology 25(2): 235-240.
- Saad, L., Jacquemart, A. L., Cawoy, V., Vanparys, V., Vervoort, A., Meerts, P., Dassonville, N., Domken, S. et Mahy, G. (2009). *Les plantes exotiques envahissantes en Belgique ont-elles des impacts ?* Parcs & Réserves, Namur, Belgium, Ardenne et Gaume 64 : 10-16
- Savchenko, R. G. and V. N. Odinkov (2012). *Hydrogenation of ecdysteroids*. Steroids 77(14): 1523-1529.
- Schauer, T. and Caspari, C. (2009). *Guide Delachaux des plantes par la couleur*. Delachaux et Niestlé. 496 p.
- Somme, L., Vadderplanck, M., Michez, D., Lombaerde, I., Moerman, R., Wathelet, B., Lognay, G. and Jacquemart A. L. (soumis). *Does pollen and nectar quality influence bumble bee flower constancy on Comarum palustre and co-occurring plant species?*
- Stout, J. C. and C. L. Morales (2009). *Ecological impacts of invasive alien species on bees*. Apidologie 40(3): 388-409.
- Stout, J. C. and D. Goulson (2002). *The influence of nectar secretion rates on the responses of bumblebees (Bombus spp.) to previously visited flowers*. Behavioral Ecology and Sociobiology 52(3): 239-246.
- Tasei, J. N. and P. Aupinel (2008). *Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumblebee workers (Bombus terrestris, Hymenoptera: Apidae)*. Apidologie 39: 397-409.

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(10): 1807-1820.

Vanderplanck, M., Moerman, R., Rasmont, P., Lognay, G., Suchail, S., Wathélet, B., Wattiez, R. and Michez, D. (soumis). *How does pollen content impact on fitness and behavior of polylectic bees?*

Vanderplanck, M., Wattiez, R., Leroy B., Wathélet B. and Michez D. (2013). *Standardised protocol to evaluate pollen proteins as bee food source*.

Weiner, C. N., Hilpert, A., Werner, M., Linsenmair, K. E. and Bluthgen, N. (2010). *Pollen amino acids and flower specialisation in solitary bees*. Apidologie 41(4): 476-487.

Williams, P. H. and J. L. Osborne (2009). *Bumblebee vulnerability and conservation world-wide*. Apidologie 40(3): 367-387.