

UNIVERSITE DE MONS
FACULTE DES SCIENCES
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Phéromones des *Subterraneobombus*
(Hymenoptera, Apidae) de la région
ouest-paléarctique**

Directeur de mémoire :
Prof. Pierre Rasmont

Mémoire de fin d'Etudes
Présenté par **Mathieu Quiniet**
En vue de l'obtention du grade
de **Maître en Sciences**
Biologiques

Année académique 2009-2010

M. Quiniet, 2010. Phéromones des *Subterraneobombus* (Hymenoptera, Apidae) de la région ouest-paléarctique. Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, 78 p.

Résumé : Le sous-genre *Subterraneobombus* est un groupe rare qui comporte 4 espèces en région ouest-paléarctique : *Bombus subterraneus*, *B. distinguendus*, *B. melanurus* et *B. fragrans*. *B. subterraneus* est la seule espèce à présenter une différenciation subsppécifique avec 4 sous-espèces : *B. s. subterraneus* dans le sud de la Scandinavie, *B. s. latreillellus* largement répandu en Europe, *B. s. tectosagorum* dans les Pyrénées et *B. s. liguriensis* dans le nord de l'Italie et les Alpes Maritimes. Au moins 3 des 4 espèces étudiées sont en nette régression presque partout (*B. melanurus* ne semble pas menacé).

Chez les bourdons, les mâles attirent les femelles en marquant différentes places avec des sécrétions céphaliques phéromonales qui sont spécifiques à l'espèce. Pour les 4 espèces étudiées, les sécrétions céphaliques n'ont pas encore été décrites. Le statut taxonomique de ces espèces a été établi uniquement sur base morphologique.

Les sécrétions céphaliques des 4 espèces étudiées ont été analysées par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse.

Les composés des sécrétions céphaliques des 4 espèces étudiées ont été identifiés pour la première fois. *B. subterraneus*, *B. distinguendus* et *B. melanurus* sécrètent des composés terpéniques (geranylcitronnellal et geranylgeranial) comme molécules majeures, alors que *B. fragrans* sécrète des dérivés d'acide gras à 18 carbones (octadecadienal, octadecenal et octadecenyl acetate).

Le statut spécifique des 4 espèces a été validé. Au niveau infraspécifique, aucune sous-espèce n'a pu être isolée par ses sécrétions céphaliques.

Mots-clés : *Subterraneobombus*, Phéromones, Taxonomie, Espèce, Variabilité.

Remerciements

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration du présent travail.

Je remercie tout particulièrement le Prof. Pierre Rasmont de m'avoir accueilli dans son service, pour ses conseils judicieux et sa constante attention.

Je tiens à exprimer ma gratitude au Prof. Irena Valterova (Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prag) de m'avoir accueilli dans son service pour l'identification des molécules phéromonales.

Je remercie les Dr. Stéphanie Iserbyt, Denis Michez et Michaël Terzo pour leur aide à diverses étapes de ce travail.

Je remercie également Mlle Audrey Coppée, M. Thibaut De Meulemeester et M. Thomas Lecocq de m'avoir guidé tout au long de cette année, pour leurs conseils avisés et leur disponibilité.

Je tiens à remercier tous les membres du Service de Zoologie de l'Université de Mons (dont Dorothee Roelants et Patrick Lhomme) ainsi que mes collègues de 2^{ème} master (Elise Bredat, Audrey Helderweirt et Arnaud Roelandts) pour leur aide, leurs encouragements et leurs conseils durant cette année. Je remercie également Laurent Crépin pour son aide technique lors des manipulations.

Je n'oublie pas ma famille et mes proches qui m'ont été indispensables dans les moments les plus difficiles.

Que toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail et que je n'ai pas citées ici sachent que je ne les oublie pas et que je les remercie.

Table des matières

1. Introduction.....	6
1.1 L'étude des bourdons.....	6
1.2 Description des espèces étudiées	7
1.2.1 <i>Bombus subterraneus</i> (L., 1758).....	9
1.2.2 <i>Bombus distinguendus</i> Morawitz, 1869	11
1.2.3 <i>Bombus melanurus</i> Lepeletier, 1836.....	12
1.2.4 <i>Bombus fragrans</i> (Pallas, 1771).....	14
1.3 La notion d'espèce	16
1.3.1 Le concept typologique.....	16
1.3.2 Le concept biologique ou concept d'isolement.....	17
1.3.3 Le concept de reconnaissance	17
1.4 Les phéromones	18
1.4.1 Les parades nuptiales	18
1.4.2 Les phéromones sexuelles.....	20
1.4.3 Nature des phéromones.....	22
1.4.4 Variabilité phéromonale.....	23
1.5 Conservation des espèces	24
1.5.1 Généralités	24
1.5.2 Le cas de <i>Bombus subterraneus</i>	27
1.5.3 Le cas de <i>Bombus distinguendus</i>	28
1.5.4 Le cas de <i>Bombus melanurus</i>	30
1.5.5 Le cas de <i>Bombus fragrans</i>	30
1.6 But.....	31
2. Matériel et méthode	32
2.1 Collecte entomologique	32
2.2 Analyse des phéromones.....	37
2.2.1 Dissection.....	37
2.2.2 Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.....	37
2.2.3 Traitement des chromatographes	39

2.2.4	<i>Analyses statistiques</i>	41
2.2.4.1	Méthode d'ordination.....	41
2.2.4.2	Méthode de groupement.....	41
3.	Résultats	42
3.1	Analyse des chromatogrammes	42
3.1.1	<i>Le sous-genre Subterraneobombus</i>	42
3.1.2	<i>Bombus subterraneus</i>	44
3.1.3	<i>Bombus distinguendus</i>	46
3.1.4	<i>Bombus melanurus</i>	48
3.1.5	<i>Bombus fragrans</i>	50
3.2	Analyses statistiques	52
3.2.1	<i>Du niveau interspécifique</i>	52
3.2.2	<i>Du niveau infraspécifique</i>	55
3.3	Comparaison des distances chimiques avec les inférences phylogénétiques....	58
4.	Discussion	59
4.1	Remarques préliminaires.....	59
4.2	Composition phéromonale des 4 espèces étudiées.....	60
4.3	Statut des espèces	63
4.3.1	<i>Interspécificité</i>	63
4.3.2	<i>Infraspécificité</i>	63
4.4	Comparaison des distances chimiques avec les inférences phylogénétiques....	64
4.5	Conservation des espèces	64
5.	Conclusion	65
6.	Perspectives	66
7.	Bibliographie	67

1. Introduction

1.1 L'étude des bourdons

Les bourdons (Hymenoptera : Apidae : Bombini) sont des insectes sociaux. Il existe plus de 250 espèces dans le monde (Williams & Osborne, 2009). Ils jouent un rôle écologique et économique primordial au sein des écosystèmes terrestres (Free, 1970 ; Osborne & Williams, 1996 ; Goulson, 2003 ; Winfree, 2008). En effet, ils pollinisent efficacement beaucoup de fleurs sauvages et cultivées (Osborne *et al.*, 1991 ; Macfarlane & Gurr, 1995). Grâce à un système de thermorégulation performant (Heinrich, 1979), ils sont en outre les seuls insectes présents dans des milieux écologiques froids où la majorité des autres pollinisateurs sont absents (Macfarlane & Gurr, 1995 ; Hines, 2008). Leur valeur et leur efficacité sont reconnues depuis longtemps (Sladen, 1912 ; Hopkins, 1914). Darwin (1886) notait déjà que la présence des bourdons est indispensable pour la pollinisation du trèfle, lequel nourrit le bétail que nous mangeons (republié par Freeman, 1968). Ce sont des indicateurs fiables de la qualité écologique des biotopes terrestres qui nous entourent (Osborne & Williams, 1996).

Chez les bourdons, le cycle de vie est annuel et la reproduction se fait sur un modèle haplodiploïde. A la fin de l'été, les reines fécondées hibernent jusqu'au printemps. A leur sortie d'hibernation, elles cherchent une cavité pour y fonder une colonie, souvent des nids abandonnés de rongeurs (Svensson, 1980). Elles donnent naissance dans un premier temps à plusieurs successions d'ouvrières diploïdes non fertiles. Ces dernières s'occupent de l'alimentation et du soin au couvain. En fin de saison, certains œufs fécondés donnent naissance à des jeunes reines. La reine pond également des œufs non fécondés qui donnent des mâles haploïdes (parthénogénèse arrhénotoque). Différentes stratégies nuptiales sont mises en jeu par les mâles pour féconder les femelles fertiles. Les futures reines s'abritent ensuite pour passer l'hiver alors que le reste de la colonie périclite.

1.2 Description des espèces étudiées

Le taxon étudié lors de ce travail est le sous-genre *Subterraneobombus* Vogt 1911. Les *Subterraneobombus* forment un groupe monophylétique parmi les bourdons (**figure 1**) et peuvent être clairement identifiés sur base de leur génitalia (Cameron *et al.*, 2007).

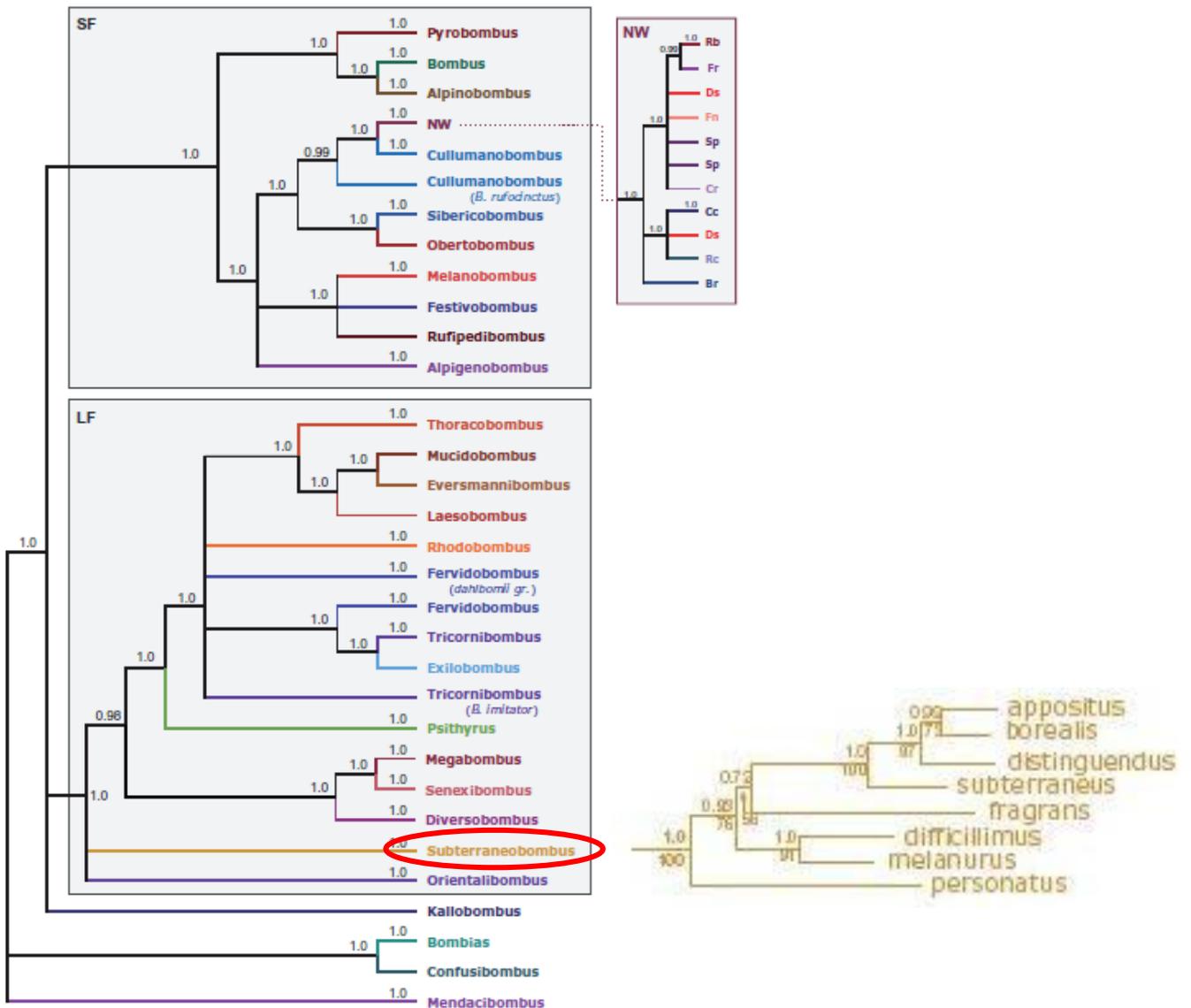


Figure 1 : Gauche : Phylogénie de *Bombus* représentant les relations entre sous-genres basé sur un arbre Bayésien (PP = 0.95) de séquences combinées de 5 fragments de gènes (16S, opsin, ArgK, EF-1 α , PEPCK). SF : Face Courte ; LF : Face Longue. Les valeurs sur les branches sont les probabilités postérieures bayésiennes. Droite : Partie de l'arbre phylogénétique des bourdons incluant les espèces *Subterraneobombus* établie sur analyse de séquences d'ADN de 5 fragments de gènes (16S, opsin, ArgK, EF-1 α , PEPCK). Les valeurs sur les branches sont les probabilités postérieures bayésiennes, les valeurs sous les branches sont les valeurs bootstrap de parcimonie (d'après Cameron *et al.*, 2007).

Williams (1998) renseigne onze espèces pour le sous-genre : *B. amurensis* Radoszkowski, 1862, *B. appositus* Cresson, 1878, *B. borealis* Kirby, 1837, *B. difficillimus* Skorikov, 1912, *B. distinguendus* Morawitz, 1869, *B. fedtschenkoi* Morawitz, 1875, *B. fragrans* (Pallas, 1771), *B. melanurus* Lepeletier, 1836, *B. personatus* Smith, 1879, *B. subterraneus* (L., 1758) et *B. tschitscherini* Behr, 1862. Les relations phylogénétiques entre huit de ces espèces sont illustrées sur la **figure 1**. En région ouest-paléarctique, quatre espèces sont présentes : *B. subterraneus*, *B. distinguendus*, *B. melanurus* et *B. fragrans* (Rasmont, 1983).

Le nid des *Subterraneobombus* est souterrain ou rarement en surface et l'élevage du couvain est de type pocket-makers (Sladen, 1912 ; Alford, 1975 ; Williams, 1988). Chez les pocket-makers, la reine et les ouvrières fabriquent des cellules adjacentes aux alvéoles contenant les œufs dans lesquelles les ouvrières déposent le pollen. Les larves se nourrissent dans ces cellules. Les reines de *Bombus subterraneus* et *Bombus distinguendus* sortent d'hibernation à la fin du printemps, ces espèces sont dites tardives (Alford, 1975 ; Edwards & Williams, 2004 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Charman *et al.*, 2009). Chez ces deux espèces, la taille de la colonie est souvent petite (Edwards, 2000). Pour *B. subterraneus*, Ponchau *et al.* (2006) renseignent un ratio de 22 reines observées pour seulement 100 ouvrières observées dans la région des Pyrénées-Orientales. Enfin, la parade nuptiale s'opère par des congrégations de mâles à l'entrée des nids pour poursuivre les reines émergentes (Reinig, 1960). Elle peut être accompagnée de circuits odorants (Williams, 1991). Ainsi, Williams (1991) a observé des mâles de *B. melanurus* en comportement de patrouille. Krüger (1951) avait également observé un mâle de *B. distinguendus* qui marquait le dessus d'un mur. En 1934, près d'un chemin de halage à Popelken (Prusse Orientale, Allemagne), Reinig (1960) a observé une douzaine de mâles de *Bombus subterraneus* à l'entrée d'un nid dans lequel des jeunes femelles étaient présentes.

1.2.1 *Bombus subterraneus* (L., 1758)

Jusque la moitié du 20^{ème} siècle, on retrouvait *Bombus subterraneus* dans toute l'Europe jusqu'en Mongolie (distribution paléarctique) (Delmas, 1976). Il a hélas disparu de beaucoup de ses habitats primaires (Alford, 1975 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Goulson & Hanley, 2004). Sa distribution est étendue mais il est plutôt rare partout (**figure 4**). *B. subterraneus* est plutôt planicole au nord de sa distribution et plutôt montagnard dans le sud, ce qui correspond à sa gamme de températures préférées (Delmas, 1976 ; Rasmont, 1999). Le modèle climatique de la « Lentille de Gorodkov » (Gorodkov, 1986) explique cette disjonction boréo-alpine. Ainsi, en Anatolie, Rasmont & Flagothier (1996) mentionnent des altitudes de 775m à 2855m, avec 80 % des observations entre 1600m et 2390m tandis que Løken (1973) renseigne les régions de basse altitude et côtières pour la Norvège et la Suède. Les types d'environnement dans lesquels on le retrouve sont principalement des milieux ouverts (Reinig, 1972 ; Løken, 1973 ; Rasmont, 1988 ; Svensson *et al.*, 2000), milieux fréquemment associés à des espèces tardives (Edwards & Williams, 2004) et à des espèces à nid souterrain (Michener, 1979). Le nid de *B. subterraneus* peut être profond de plusieurs mètres (Hoffer, 1882). En montagne, on le retrouve dans les adrets secs et herboux de l'étage montagnard (Rasmont, 1988).

B. subterraneus est une espèce variable qui comporte quatre sous-espèces :

- *B. s. subterraneus* (L.) présent en Scandinavie (**figure 2**),
- *B. s. latreillellus* (Kirby) avec une distribution large en Europe (**figure 3**) et une grande variabilité individuelle (Tkalčů, 1974b),
- *B. s. liguriensis* (Rasmont) dans le nord de l'Italie et les Alpes Maritimes,
- *B. s. tectosagorum* (Kruseman) dans les Pyrénées.

Ce dernier auteur (Kruseman, 1958) avait séparé les populations pyrénéennes claires sous le nom de *tectosagorum*, caractérisées par un éclaircissement de la partie antérieure du second tergite et l'étendue du collare. Toutefois, selon Delmas (1976), cet isolement semble illusoire. Rasmont (1988) a également abandonné cette nomenclature car entre les sous-espèces *tectosagorum* et *latreillellus*, la différence est minime ou nulle. Nous envisagerons cette séparation dans la discussion. La sous-espèce sombre *liguriensis* semble proche de la sous-espèce *subterraneus* du sud de la Scandinavie mais elle en est séparée par un large territoire où on ne trouve que *latreillellus*, avec quelques rares spécimens sombres aberrants (Rasmont, 1988). Une femelle « noire avec peu de poils clairs au pronotum et les 3 derniers segments bruns » avait déjà été récoltée en Belgique en 1915 (Ball, 1920). La disjonction alpine aurait donc mené à la subséciation allopatrique de *B. s. liguriensis*. Bien qu'il ne lui ait pas donné de nom, Reinig (1970) avait déjà accordé le statut de bonne sous-espèce à la population du nord des Apennins. *B. subterraneus* est la seule des quatre espèces

étudiées qui présente une différenciation subsppécifique, avec quatre sous-espèces.



Figure 2 : *Bombus subterraneus subterraneus* (L.). Photo et schéma de P. Rasmont (com. pers.).



Figure 3 : *Bombus subterraneus latreillellus* (Kirby). Photo de J. Neumayer (d'après Rasmont *et al.*, 2009).

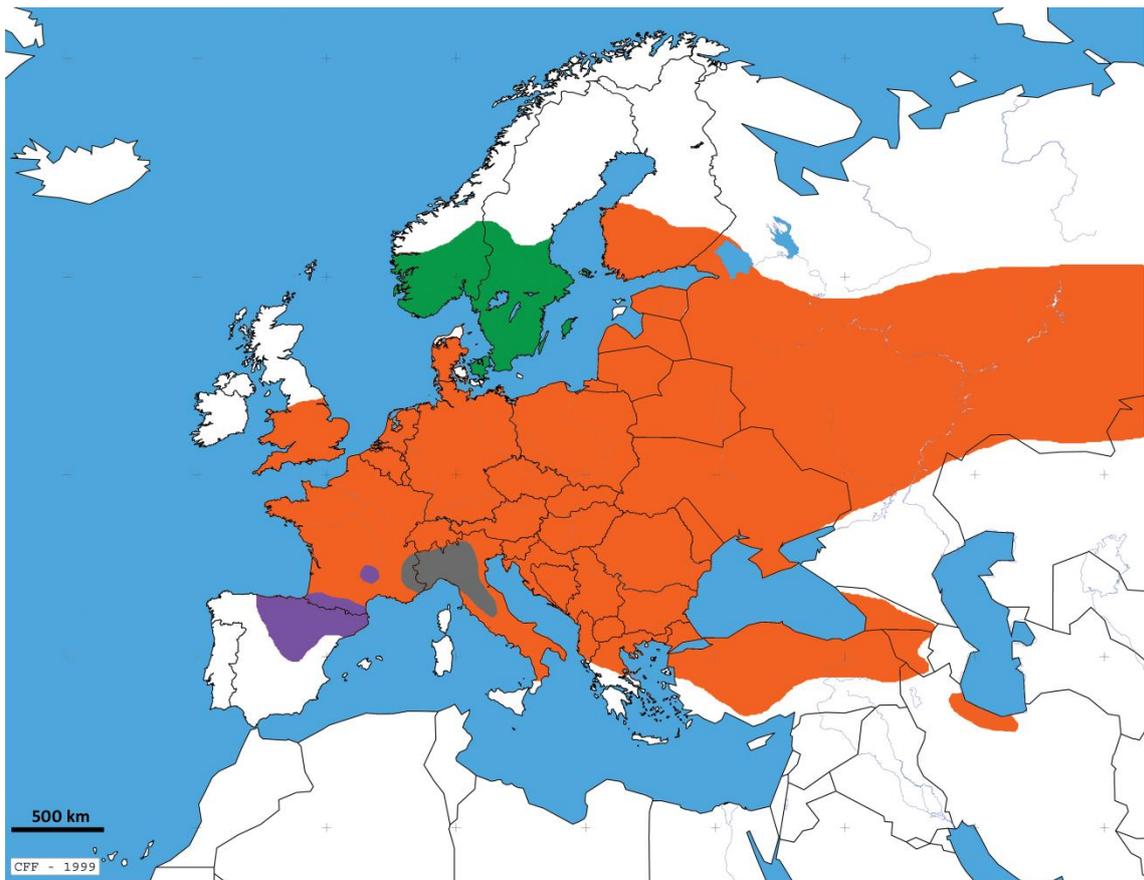


Figure 4 : Distribution de *B. subterraneus* en région ouest-paléarctique. Orange : *B.s.latreillellus* ; vert : *B.s.subterraneus* ; mauve : *B.s.tectosagorum* ; gris : *B.s.liguriensis* (d'après les données de Rasmont, in prep.).

1.2.2 *Bombus distinguendus* Morawitz, 1869

Bombus distinguendus, tout comme *B. subterraneus*, présente une large distribution en région ouest-paléarctique malgré une faible densité (figure 6). Il s'étend à l'est jusqu'à l'archipel des Aléoutiennes avec un enregistrement récent dans l'île Attu (Williams & Thomas, 2005). A la différence de *B. subterraneus*, on ne le retrouve pas sous le 45ème parallèle (Rasmont, 1988). *B. distinguendus* présente une distribution eurosibérienne (Tkalčů, 1974b ; Rasmont, 1988). C'est une espèce de basse altitude, elle est donc absente là où *B. subterraneus* est montagnard ou colinéen. *B. distinguendus* est une espèce tardive (Charman *et al.*, 2009). Les habitats de *B. distinguendus* sont renseignés comme des habitats ouverts tels que des champs, des prairies, des marais (Reinig, 1972 ; Rasmont, 1988). Aucune variabilité géographique notable ne laisse apparaître de différenciation subsppécifique (figure 5).



Figure 5 : *Bombus distinguendus* Morawitz. Photo et schéma de P. Rasmont (d'après Pauly & Rasmont, 2010).

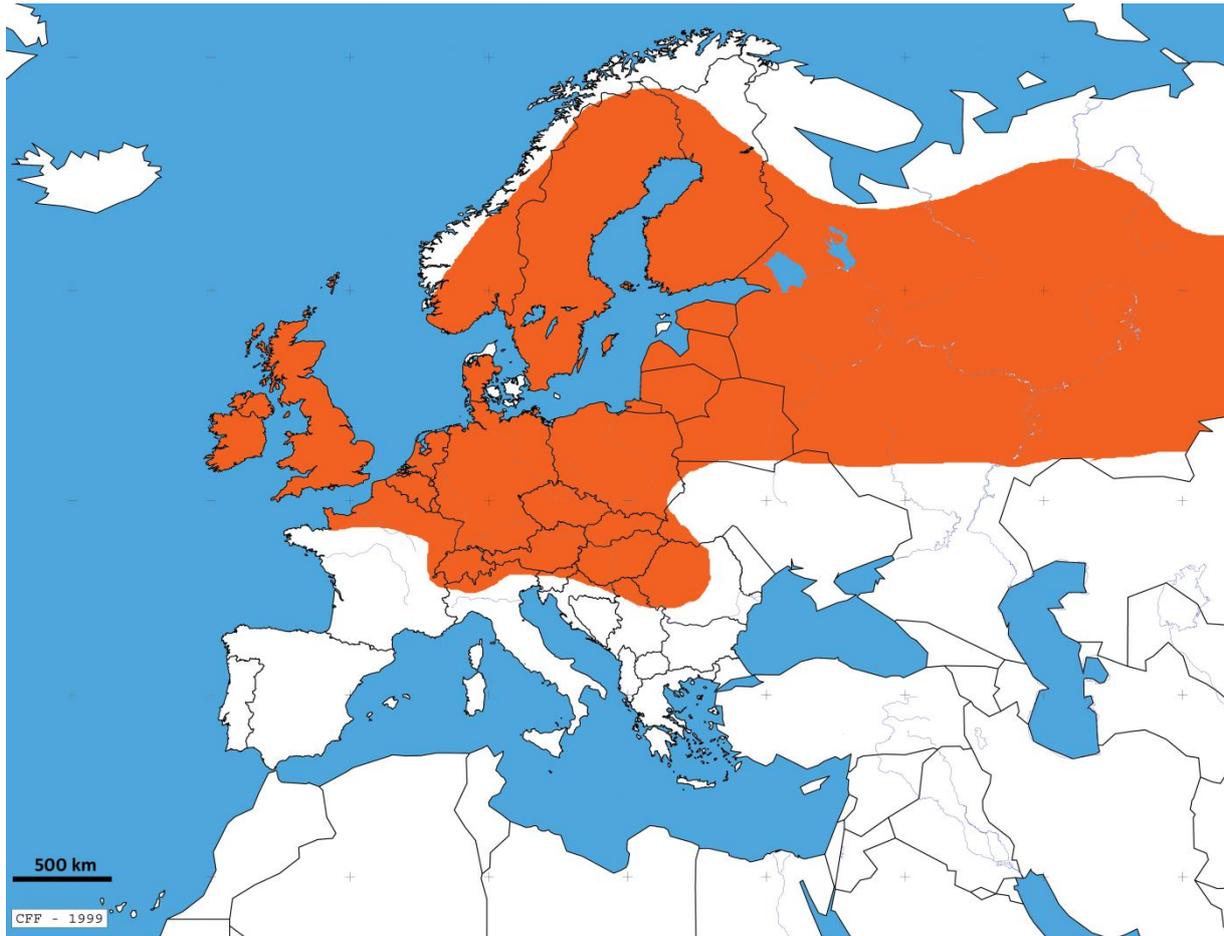


Figure 6 : Distribution de *B. distinguendus* en région ouest-paléarctique (d'après les données de Rasmont, in prep.).

1.2.3 *Bombus melanurus* Lepeletier, 1836

La troisième espèce, *Bombus melanurus*, n'est présente qu'en Turquie, Arménie, dans le nord de l'Iran et semble-t-il dans le Caucase (Rasmont, in prep.) (**Figure 8**). A l'est, il s'étend jusqu'à l'Altaï, en Asie Centrale (distribution ouest-paléarctique). Cette espèce est très proche phénotypiquement et phylogénétiquement de *B. difficilimus* (Tkalčú, 1974a ; Cameron *et al.*, 2007), et phénotypiquement de *B. tschitscherini* et *B. fedtschenkoi* (Tkalčú, 1974b ; Rasmont, in prep.). On la retrouve uniquement en haute altitude. Rasmont & Flagothier (1996) renseignent un intervalle de 1750-3500m avec 80% des observations entre 1950m et 2855m. En Turquie, on la retrouve dans les steppes alpines ou dans l'étage supérieur des steppes sub-alpines à *Astragalus*. Les reines de *Bombus melanurus* et *Bombus fragrans* sont les plus grosses reines observées chez les bourdons de la région ouest-paléarctique. L'espèce est peu variable (**figure 7**).



Figure 7 : *Bombus melanurus* Lepeletier. Photo et schéma de P. Rasmont (d'après Rasmont *et al.*, 2009).



Figure 8 : Distribution de *B. melanurus* en région ouest-paléarctique (d'après les données de Rasmont, in prep.).

1.2.4 *Bombus fragrans* (Pallas, 1771)

Bombus fragrans est présent en Turquie, dans le Caucase, en Ukraine, Hongrie, Autriche et s'étend jusqu'en Mongolie (**figure 11**). En Europe, la distribution est disjointe, avec un isolat correspondant à la Basse-Autriche et à la Hongrie et une zone orientale centrée sur l'Ukraine (Rasmont, in prep.). Son habitat est très restreint, l'espèce est fortement accommodée aux steppes à *Astragalus*. Ce choix écologique explique certainement sa rareté, tandis que l'altitude ne semble pas prépondérante. Dû à sa restriction d'habitat, *B. fragrans* est menacé pratiquement partout, où les steppes sont remplacées par des cultures. Une contrainte supplémentaire est que la reine de *Bombus fragrans* niche dans d'anciens terriers de sousliks *Citellus suslicus* (**Figure 10**) (Grinfel'd, 1978). L'espèce est donc fortement dépendante de la présence de ce rongeur. En Anatolie, Rasmont & Flagothier (1996) l'indiquent dans un intervalle de 1000 à 2325 m avec 80% des observations entre 1370 et 1950 m (médiane : 1500 m, n=151). Hormis la taille, la coloration de *B. fragrans* rappelle celle de *B. distinguendus*. L'espèce ne présente pas de subspéciation (**Figure 9**).

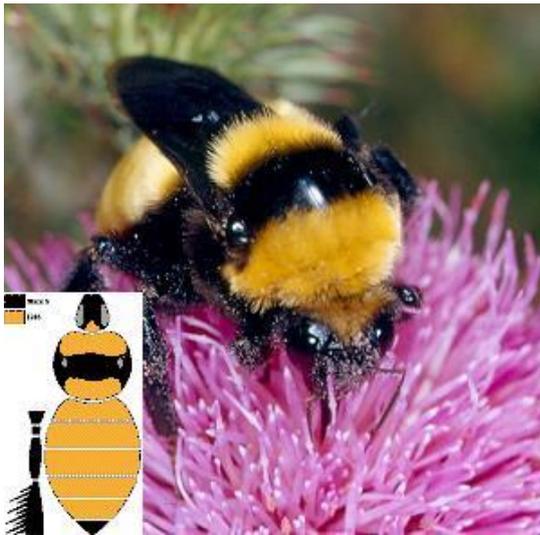


Figure 9 : *Bombus fragrans* (Pallas). Photo (d'après www.wildbienen.de) et schéma de P. Rasmont (d'après Rasmont *et al.*, 2009).

Figure 10 : Le souslik *Citellus suslicus*. Photo de P. Rasmont (d'après Rasmont *et al.*, 2009).



Figure 11 : Distribution de *B. fragrans* en région ouest-paléarctique (d'après les données de Rasmont, in prep.).

1.3 La notion d'espèce

L'espèce est une unité taxonomique de la classification biologique. Cette notion a déjà fait couler beaucoup d'encre. Jusqu'à présent, aucun biologiste n'est parvenu à fournir une définition universelle de ce concept systématique.

Une bonne classification taxonomique est un pré-requis majeur dans la conservation des espèces menacées (Daugherty *et al.*, 1990). Elle évite de prendre des décisions malvenues concernant la maintenance des espèces à risque (Rémy, 2009). Ainsi, à titre de contre-exemple, le sphenodon, seul genre survivant de l'ordre des Rynchocéphales, a souffert de cette mauvaise évaluation. Malgré un statut de conservation depuis 1895, une mauvaise classification a entraîné le quasi déclin d'une des deux espèces du genre (Daugherty *et al.*, 1990). Les efforts et budgets de conservation doivent être guidés par une taxonomie cohérente.

1.3.1 Le concept typologique

Le concept typologique, qui remonte à Aristote et qui a été mis en valeur par Linné, se base sur la similitude morphologique pour définir un nombre limité de types (Mayr, 1942 ; Mayr, 1974). L'espèce est définie sur base des ressemblances avec un type. Dans cette classification, les caractéristiques morphologiques fournissent des éléments valables pour la détermination du statut de l'espèce. La spéciation résulte de la sélection divergente, menant à l'extinction des intermédiaires (Darwin, 1859). Chez les bourdons, les caractères morphologiques sont robustes au niveau taxonomique des sous-genres (Richards, 1968 ; Williams *et al.*, 2008).

Dans certains cas toutefois, on s'est aperçu qu'on ne peut se baser sur la morphologie pour décrire une espèce. Il existe chez beaucoup de groupes des plus grandes différences morphologiques entre les individus conspécifiques (variation infraspécifique individuelle) qu'entre des espèces parentes (Mayr, 1974). Dans de nombreux groupes d'oiseaux (oiseaux de paradis, oiseaux-mouches, fauvettes), de poissons (poissons abyssaux) voir même de parasites d'hyménoptères (Mayr, 1974), la femelle peut être plus différente des mâles de sa propre espèce que des femelles des espèces voisines. Chez les bourdons, on ne peut se baser sur la coloration seule pour décrire les espèces (Williams, 1991). En effet, de nombreuses espèces présentent un même type de coloration par convergence chromatique régionale (Delmas, 1976 ; Rasmont, 1988 ; Bertsch *et al.*, 2005a ; Rasmont *et al.*, 2005b). Certaines espèces présentent également des sous-espèces polytypiques, conséquence des isolations lors des glaciations du quaternaire (phénomène d'hétérochromie) (Delmas, 1976). Par exemple, l'espèce *B. terrestris* présente 10 sous-espèces (Rasmont *et al.*, 2008) et *B.*

pascuorum 30 (Krüger, 1928 ; Rasmont, 1983). En outre, des populations naturelles morphologiquement similaires ou identiques peuvent manifester un isolement reproductif (cas du moustique *Anopheles* responsable du paludisme (Mayr , 1974)).

1.3.2 Le concept biologique ou concept d'isolement

Mayr (1963) propose de définir les espèces comme des groupes de populations naturelles capables d'intercroisement et qui sont reproductivement isolées d'autres groupes. Dans ce concept biologique, deux individus appartiennent à la même espèce s'ils se reproduisent dans des conditions naturelles. L'espèce est une unité génétique constituée d'un grand pool de gènes intercommunicants (Mayr, 1974). Les sous-espèces sont définies comme des populations géographiquement ou individuellement variables à l'intérieur d'une espèce. Différents mécanismes d'amixie sont observés entre les espèces : géographiques, éthologiques, chimiques, anatomiques, phénologiques (Mayr, 1963).

Certains exemples échappent également à cette conception classique. Des hybrides viables sont observés chez certains animaux (mulets), même entre familles différentes chez certaines tortues (Vetter & Van Pijl, 2006). Des problèmes s'observent également lorsqu'on étudie des espèces rares, parthénogénétiques ou avec une spéciation parapatrique progressive en anneau. Ainsi, chez le goéland brun, les différentes sous-espèces s'accouplent de proche en proche alors que les sous-espèces en bout de chaîne ne peuvent se reproduire (Stresemann & Timofeeff-Ressovsky, 1947). Dans le cadre de la récolte de bourdons, ce concept est inapplicable pour regrouper des individus en espèces.

1.3.3 Le concept de reconnaissance

Dans le « *Species Recognition System* » de Paterson (1985, 1993), l'espèce est définie comme l'ensemble des individus qui se reconnaissent comme conjoints potentiels grâce à un même système de recherche et de reconnaissance sexuelle (SMRS). Déjà en 1903, Petersen écrivait : « C'est un fait que chaque espèce animale a des moyens qui lui permettent la reconnaissance et l'approche d'animaux conspécifiques du sexe opposé (...) ». Contrairement au concept biologique, ce n'est donc pas l'isolement des individus qui caractérise l'espèce mais bien les stimuli sexuels qui permettent la reconnaissance des conjoints. Ce concept est particulièrement opérationnel lorsqu'il est appliqué aux bourdons (Rasmont *et al.*, 2005b ; Terzo *et al.*, 2005). Il permet d'éclairer certaines difficultés rencontrées avec le concept biologique concernant la dynamique des mécanismes d'isolement (Williams 1991). Ce concept peut être validé par l'électroantennographie (Gorez, 2007) ou par

des tests éthologiques (Terzo & Sinkevitch, 2005 ; Matty, 2007 ; Helderweirt, 2010).

1.4 Les phéromones

Chez les bourdons, la recherche et la reconnaissance d'un conjoint se font principalement par l'intermédiaire de signaux chimiques sexuels attractifs : les phéromones (Cederberg *et al.*, 1984). D'après le concept de Paterson, elles semblent constituer l'outil le plus efficace pour définir l'espèce chez les bourdons (Calam, 1969 ; Kullenberg & Bergström, 1975 ; Svensson, 1979 ; Bergström, 1981 ; Terzo *et al.*, 2003). Les taxons présentant les mêmes combinaisons de phéromones labiales céphaliques sont attirés sexuellement. Ils peuvent donc être considérés comme conjoints potentiels et donc conspécifiques (Rasmont *et al.*, 2005b). D'une manière générale, la connaissance des structures chimiques des phéromones joue un rôle important dans la systématique en biologie (Jackson & Morgan, 1993).

1.4.1 Les parades nuptiales

Il existe 3 types de stratégies d'accouplement chez les bourdons (Haas, 1949 ; Schremmer, 1972 ; Williams, 1991 ; Kindl *et al.*, 1999) : (1) Le comportement de patrouille, (2) le comportement de perchoir et (3) l'attente à la sortie du nid.

(1) Chez la majorité des espèces, les mâles établissent un circuit en marquant différents objets (brindilles, feuilles, troncs) de leurs sécrétions céphaliques en vue d'attirer des reines vierges conspécifiques (**figures 12 et 13**) (Svensson, 1979 ; Bergström *et al.*, 1981 ; Cederberg *et al.*, 1984 ; Williams, 1991 ; Bergman, 1997). Les marquages sont effectués principalement le matin (Ågren *et al.*, 1979). Les mâles patrouillent ensuite le long de ce circuit à la recherche de leur future partenaire (**figure 13**) (Haas, 1949 ; Ågren *et al.*, 1979). Cette parade est prédominante en milieu forestier (Williams, 1991). Les circuits de vol des mâles sont souvent grands (plusieurs hectares) et peuvent se chevaucher (Free, 1987). Chez certaines espèces comme *B. terrestris* (L.), les reines préfèrent les places qui ont été marquées par plusieurs mâles (Ågren *et al.*, 1979 ; Svensson, 1980 ; Maccagnani *et al.*, 1994), ce qui suggère que la coopération entre mâles peut améliorer la probabilité d'attirer les femelles. Žaček *et al.* (2009) suggèrent que les jeunes mâles de *B. terrestris* pourraient avoir un avantage sur les vieux mâles dans l'attraction des reines, car leurs marquages contiennent des plus grandes quantités de sécrétions des glandes labiales que ceux des mâles plus âgés.

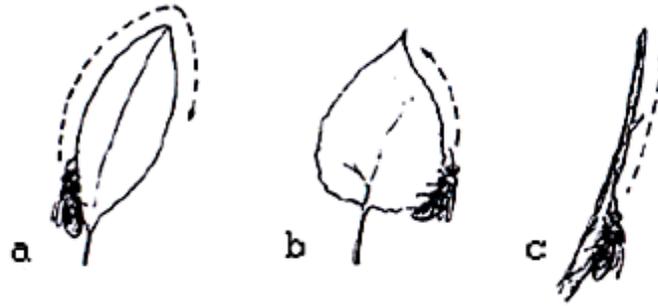


Figure 12 : Comportement de marquage d'un mâle de *Bombus lapponicus* (Fabricius) : (a) sur une feuille de *Salix glauca* L., (b) sur une feuille de *Betula tortuosa* L., et (c) sur une branche sèche de *Betula nana* L. (d'après Svensson, 1979).

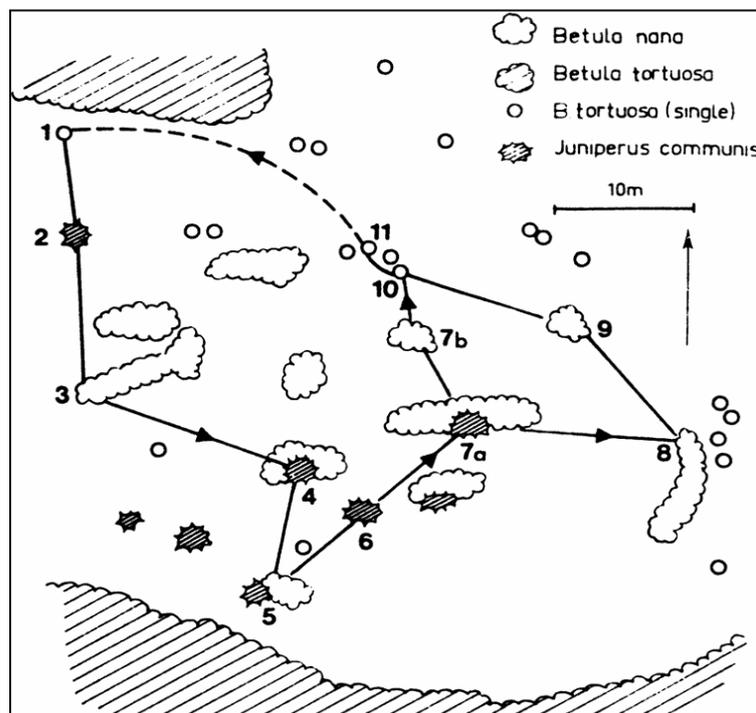


Figure 13 : Circuit de patrouille (flèches) et de marquage (numéro 1-11) d'un mâle de *Bombus flavidus* Eversmann dans un terrain marécageux à Abisko, en Laponie suédoise. Longueur du parcours : 130m (d'après Cederberg *et al.*, 1984).

(2) Chez d'autres espèces comme *Bombus confusus* Schenck, le mâle attend la femelle à l'affût sur des objets proéminents (Schremmer, 1972). Dans un territoire d'environ deux mètres de diamètre, il effectue des vols très rapides sur tout ce qui traverse son aire de vol, espérant y trouver une femelle vierge conspécifique (Schremmer, 1972). Des marquages ont également été observés pour cette parade (Kindl *et al.*, 1999 ; Rasmont *et al.*, 2005b). Les sites d'accouplement sont généralement des milieux ouverts. Dans cette stratégie d'affût, les yeux, ailes et thorax très développés des mâles améliorent la poursuite (dimorphisme sexuel). Les stimuli visuels semblent jouer un rôle majeur dans ce comportement. La parade est

semblable chez *Bombus mendax* Gerstaecker en Europe (Haas, 1976), chez *Bombus asiaticus* Morawitz, *Bombus rufofasciatus* Smith et *Bombus kashmirensis* Friese en Asie (Williams, 1991) et chez *Bombus nevadensis* Cresson et *Bombus griseocollis* De Geer en Amérique du nord (Bertsch *et al.*, 2005b). En fonction de la défense du site perchoir, Williams (1991) sépare cette parade en comportement de course ou comportement territorial. La seconde parade se distingue de la première par une compétition des mâles pour les sites préférentiels qui découle souvent de milieux plus faibles en ressources (Williams, 1991).

(3) Enfin, chez certaines espèces comme *Bombus subterraneus* (L.) ou *Bombus ruderarius* (Müller), les mâles, souvent en groupes, attendent les femelles vierges à la sortie du nid (Krüger, 1951). Cette attente peut être accompagnée de circuits courts. Krüger (1951) remarque que l'accouplement a souvent lieu à l'intérieur même du nid des jeunes femelles chez *B. subterraneus* ou *B. ruderarius*. Généralement, les insectes utilisant cette attente des femelles produisent des quantités minimales de substances attractantes sexuelles (Phelan, 1997 ; Terzo *et al.*, 2007a ; Terzo *et al.*, 2007b). Williams (1991) a observé cette parade majoritairement dans les milieux extrêmes, les bourdons maximisant leur succès de reproduction.

1.4.2 Les phéromones sexuelles

Une phéromone est un ensemble de composés chimiques qui portent une stimulation et induisent une réponse chez un individu de la même espèce (Karlson & Lüscher, 1959). Il existe différents types de phéromones comme les phéromones d'alarme, de piste, de marquage, d'activités nuptiales (Jackson & Morgan, 1993). On appelle phéromones d'activités nuptiales ou sexuelles l'ensemble des molécules qui stimulent une ou plusieurs réactions comportementales chez le sexe opposé, permettant de rapprocher les sexes en vue de l'accouplement (Shorey, 1973). Chez les bourdons, les phéromones sexuelles constituent l'élément majeur par lequel les individus peuvent retrouver un conjoint potentiel (Williams, 1991).

Les mâles de bourdon attirent les femelles en marquant différentes places avec des phéromones sexuelles qui sont spécifiques de l'espèce (Calam, 1969 ; Bergström & Svensson, 1973 ; Svensson, 1980 ; Kindl *et al.*, 1999). Les femelles peuvent discriminer leur partenaire sexuel potentiel grâce aux phéromones qu'ils émettent (Alcock *et al.*, 1978 ; Thornhill & Alcock, 1983 ; Bergman & Bergström, 1997 ; Ayasse *et al.*, 2001).

Chez les bourdons, les phéromones sexuelles sont produites par une partie des glandes labiales céphaliques (GLC) situées derrière les yeux (**figure 14**)

(Kullenberg *et al.* 1973 ; Ågren *et al.*, 1979). Les sécrétions de ces glandes acineuses sont rassemblées au niveau de la bourse et un canal excréteur relie la bourse à la base de la langue. Chez certaines espèces, des mouvements de toilette déposent ces phéromones sur tout le corps du bourdon (Ågren *et al.*, 1979). Grâce à ses barbae mandibularis, le bourdon dépose les phéromones par mordillement de certains objets (Svensson, 1979). La perception des phéromones se fait par des sensilles olfactives localisées sur les antennes (Schneider, 1963 ; Homberg, 2004).

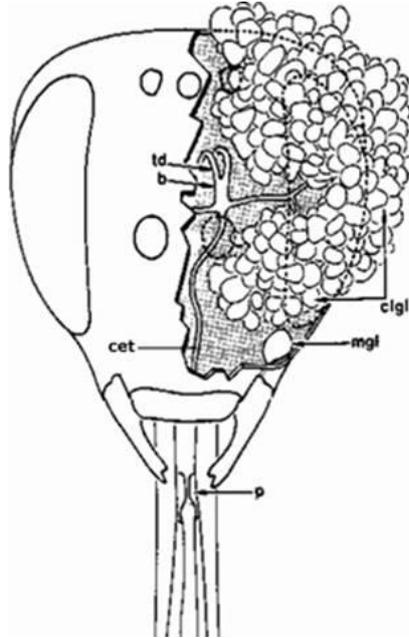


Figure 14 : Dessin semidiagrammatique de la tête de *Bombus lapidarius* (L.) mâle en vue frontale.
 b : bourse ; cet : canal excréteur terminal ; clgl : glande labiale céphalique ; mgl : glande mandibulaire ;
 p : paraglosse ; td : conduits de la glande labiale thoracique (d'après Ågren *et al.*, 1979).

Les phéromones sexuelles sont dites attractantes lorsqu'elles attirent les conjoints à longue distance, alors qu'elles sont dites arrêtantes lorsqu'elles sont actives à faible échelle et stimulent l'accouplement (Ayasse *et al.*, 2001). Les molécules les plus légères attirent à longue distance. Les plus lourdes, moins volatiles, sont responsables du facteur arrêtant des phéromones.

Jusque maintenant, les sécrétions de plus de 30 espèces de bourdon d'Europe ont déjà été décrites (Terzo *et al.*, 2003). Bergman (1997) notait que les molécules présentes sous forme de traces (- de 1%) n'ont pas de rôle utile dans le phénomène de reconnaissance intraspécifique puisqu'elles ne déclenchent pas de réponses perceptibles à l'électroantennographie. Pourtant, Šobotník *et al.* (2008) ont démontré que plusieurs composés mineurs peuvent être actifs pour l'antenne, ce qui suggère que la spécificité des phéromones de marquage est maintenue par un mélange de composés plutôt que par un ou deux composés majeurs. Šobotník *et al.* (2008) puis Žaček *et al.* (2009) ont relevé 6 composés réactifs sur l'antenne chez *B. terrestris* et 9 chez *B. lucorum*.

Les sécrétions de *B. mesomelas* Gerstaecker, *B. pomorum* (Panzer) et *B. brodmanni* (Vogt) du sous-genre *Rhodobombus* sont connues pour être extrêmement réduites, 100 à 1000 fois moins concentrées que chez les autres espèces (Valterová *et al.*, 2001 ; Terzo *et al.*, 2007a ; Terzo *et al.*, 2007b). Pour au moins les deux premières espèces, les sécrétions ne sont pas utilisées pour attirer les femelles vierges à longue distance, comme c'est le cas pour les autres espèces de bourdon (Terzo *et al.*, 2007a). L'ultrastructure et l'histologie révèle des glandes très réduites et des barbae mandibularis absents (organes de dépôt de sécrétion) (Terzo *et al.*, 2007a). Les mâles du sous-genre *Rhodobombus* ne se servent pas de leurs sécrétions labiales céphaliques pour attirer les femelles à distance (Terzo *et al.*, 2007a). Les auteurs suggèrent qu'une parade d'attente des mâles à la sortie du nid des jeunes femelles explique cette absence de sécrétions attractives chez les mâles.

1.4.3 Nature des phéromones

Les composés chimiques peuvent être des terpènes, des hydrocarbures aliphatiques et des longues chaînes de cétones, d'acétates, d'alcools ou d'aldéhydes aliphatiques (**Figure 15**). Il existe deux voies de synthèse des phéromones sexuelles : la voie des isoprénoïdes (ou mévalogénines ou terpénoïdes) et la voie des dérivés d'acides gras. Chez les bourdons, les phéromones consistent en une mixture caractéristique de composés dans des proportions spécifiques de l'espèce (Bergström, 1981 ; Mori, 1998).

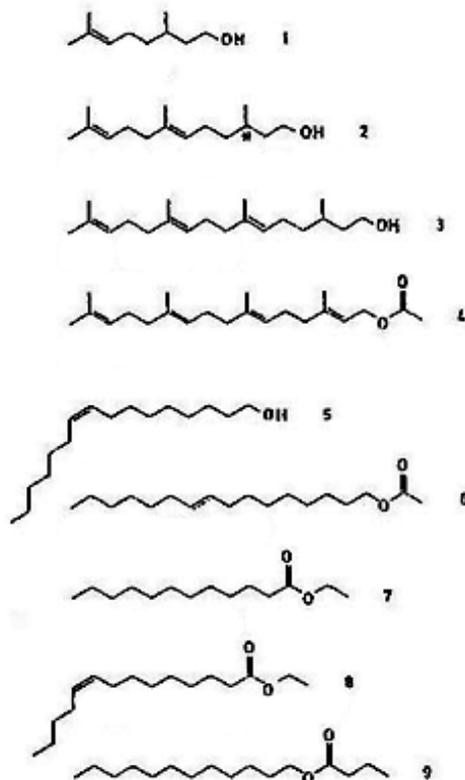


Figure 15 : Diversité dans la nature chimique des molécules phéromonales. 1-4 : terpénoïdes ; 5 : alcool ; 6 : acétate ; 7-9 : esters (d'après Bergström *et al.*, 1981).

1.4.4 Variabilité phéromonale

La composition phéromonale est décrite par Svensson & Bergström (1977) et par Hovorka *et al.* (2006) comme stable à l'intérieur d'une espèce indépendamment de la localité, contrairement à la coloration. Jusqu'il y a peu, on pensait que les quelques variations observées dans les sécrétions des GLC de mâles conspécifiques étaient dues davantage à l'âge ou à la saisonnalité qu'à la variation géographique (Svensson & Bergström, 1977 ; Ågren *et al.*, 1979). Cependant, chez *B. terrestris*, des divergences notables existent dans la composition phéromonale de sous-espèces d'origine géographique différente (Coppée *et al.*, 2008). Ainsi, le (E)-2,3-dihydrofarnésol est le composé principal chez les sous-espèces *B.t.dalmatinus* et *B.t.sassaricus*, alors qu'il s'agit du dihydrofarnésyl dodécanoate chez *B.t.terrestris* et *B.t.lusitanicus* (Coppée *et al.*, 2008). Il a été démontré par Matty (2007) que les reines de *Bombus terrestris* sont plus attirées par les sécrétions labiales céphaliques de mâles de leur propre sous-espèce.

La composition des sécrétions des glandes labiales céphaliques varie aussi avec l'âge (Ågren *et al.*, 1979 ; Coppée, 2005 ; Šobotník *et al.*, 2008 ; Žaček *et al.*, 2009). Kullenberg *et al.* (1970) remarquaient que les spécimens de fin de saison avaient des compositions phéromonales différentes des spécimens collectés plus tôt. Les acini des glandes labiales céphaliques se différencient et se remplissent au cours de la vie du bourdon, pour dégénérer en fin de vie (Ågren *et al.*, 1979 ; Šobotník *et al.*, 2008). Il existe une progression dans la synthèse des différents composés phéromonaux (Coppée, 2005 ; Šobotník *et al.*, 2008 ; Žaček *et al.*, 2009). Cette variation est à prendre en compte lors d'études chémotaxonomiques d'espèces proches (Žaček *et al.*, 2009).

Enfin, s'ajoute la variabilité intraspécifique individuelle (Barrows *et al.*, 1975 ; Ågren *et al.*, 1979 ; Terzo *et al.*, 2005). Les signatures d'identité individuelle mâles pourraient permettre aux femelles de choisir entre des conjoints potentiels (Ayasse *et al.*, 2001).

1.5 Conservation des espèces

1.5.1 Généralités

Les bourdons ont souffert d'un déclin en abondance et d'une réduction des habitats ces soixante dernières années à travers toute l'Europe (Williams, 1986 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Rasmont *et al.*, 1993 ; Rasmont *et al.*, 1995 ; Rasmont *et al.*, 2005a ; Kosior *et al.*, 2008 ; Goulson *et al.*, 2008 ; Williams & Osborne, 2009). Beaucoup d'espèces de bourdons sont en régression considérable en Belgique, surtout celles de terrains ouverts dont *B. subterraneus* et *B. distinguendus* (Rasmont, 1988 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Rasmont *et al.*, 1993 ; Rasmont *et al.*, 2005a). Les populations de bourdons sont en nette régression en Grande-Bretagne (Williams, 1986 ; Edwards & Williams, 2004 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Goulson *et al.*, 2006) et en Europe Centrale (Kosior *et al.*, 2007). Les bourdons sont également en déclin aux Pays-Bas (Peeters & Reemer, 2003).

Les bourdons sont entièrement dépendants des fleurs pour leur alimentation en pollen et nectar. La régression considérable des bourdons s'explique principalement par l'intensification agricole à travers la fertilisation azotée et la régression des cultures de *Fabaceae* (**figure 16**) et par les pratiques de désherbage (Rasmont, 1988 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Goulson 2003 ; Edwards & Williams, 2004 ; Rasmont *et al.*, 2005a ; Kosior *et al.*, 2007 ; Redpath *et al.*, 2010). En Grande-Bretagne, 90% des prairies naturelles ont été perdues entre 1932 et 1984 (Howard *et al.*, 2003). L'intensification agricole et l'urbanisation ont considérablement réduit les zones propices aux espèces qui nichent sous le sol (Banaszak, 1992 ; Svensson *et al.*, 2000 ; Goulson, 2003 ; Rasmont *et al.*, 2005a). Le développement de pathogènes (*Crithidia bombi* ou *Aethina tumida* Murray) ou de virus (ailes déformées) semble également jouer un rôle (Thorp & Shepherd, 2005 ; Colla *et al.*, 2006 ; Ruiz-Gonzalez & Brown, 2006 ; Genersch *et al.*, 2006). Les changements climatiques ne semblent pas prépondérants dans le déclin des bourdons, bien qu'une augmentation de la variation du climat pourrait agir (Williams *et al.*, 2007 ; Williams & Osborne, 2009). Enfin, il a été démontré par Thompson (2001) que la plupart des insecticides sont toxiques pour les bourdons.

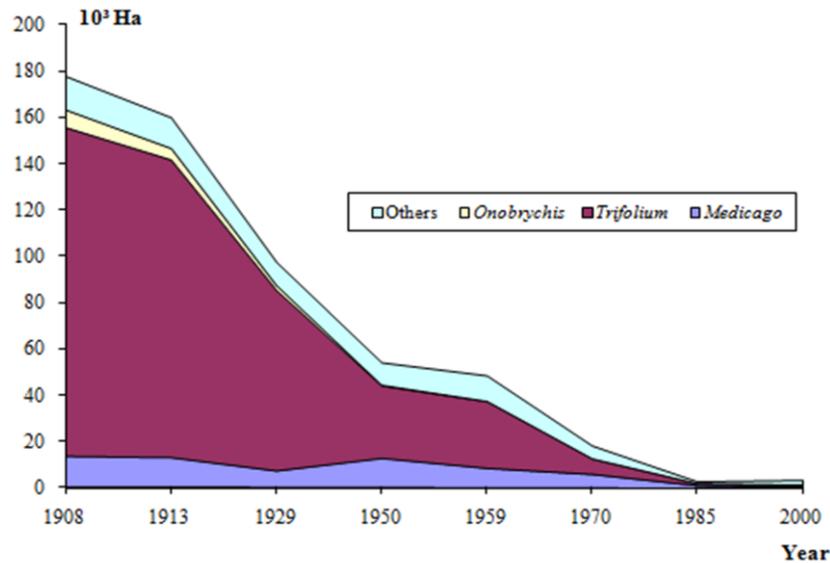


Figure 16 : Régression des cultures de *Fabaceae* durant le 20ème siècle (d'après Patiny *et al.*, 2009).

Pour les espèces rares, le facteur de régression le plus important est la fragmentation et la diminution des habitats (Williams, 1986 ; Williams *et al.*, 2007). Selon Rasmont & Mersch (1988), Rasmont *et al.* (2005a) et Goulson *et al.* (2006), ce sont les ressources alimentaires en déclin qui déterminent la régression des bourdons. Dans ce contexte, les espèces les plus spécialisées sont les plus menacées. Les espèces les plus sévèrement touchées tendent à être celles à longue langue associées à des fleurs à corolle longue (Goulson *et al.*, 2005 ; Goulson 2009). Le sous-genre *Subterraneobombus* cumule beaucoup de facteurs à risque : les espèces semblent avoir une faible tolérance climatique, leurs colonies sont petites et tardives et elles sont très dépendantes des fleurs à corolle longue dont surtout les *Fabaceae* (Edwards & Williams, 2004 ; Goulson & Darvill, 2004 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Williams & Osborne, 2009).

D'une manière générale, les bourdons sont très dépendants des plantes à corolle longue, et plus particulièrement des *Fabaceae* (Rasmont, 1988, 1995 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Rasmont *et al.*, 1993 ; Goulson & Darvill, 2004 ; Goulson *et al.*, 2005). Les choix floraux des *Subterraneobombus* s'orientent majoritairement vers les *Fabaceae*, ainsi que, dans une moindre mesure, les *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Scrophulariaceae* et *Boraginaceae* (Rasmont, 1988 ; Charman *et al.*, 2009). D'après Goulson (2009), 90-100% du pollen ingéré par *B. subterraneus* et *B. distinguendus* proviendrait des *Fabaceae*. *B. subterraneus* semble mésolectique (de 10 à 20 familles et plus de 10 taxons visités) alors que *B. distinguendus* semble quasi-oligolectique (moins de 10 familles et moins de 10 taxons visités) (Rasmont, 1988). Le polylectisme apparaît comme un facteur important de prospérité d'une espèce de bourdon (Rasmont, 1988). De la même manière, si l'oligolectisme réduit la compétition interspécifique, elle implique une

dépendance des bourdons vis-à-vis de leurs sites préférentiels (Rasmont, 1988). Goulson & Darvill (2004) suggèrent que les bourdons rares en Grande-Bretagne ont pour la plupart une diète spécialisée. En effet, plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que la majorité des bourdons dépendant des *Fabaceae* pour leur alimentation sont devenus rares ou disparaissent (Rasmont & Mersch, 1988 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Rasmont *et al.*, 2005a ; Goulson, 2009). Au plus la spécialisation alimentaire est grande, au plus les espèces rares courent un risque (Williams, 2005). La modification importante et actuelle des habitats affecte considérablement les espèces associées à un faible nombre de plantes (Goulson *et al.*, 2006). Williams (1988) avance que les espèces rares tendent à être celles qui sont à la limite de leur gamme de température latitudinale. Si l'habitat se dégrade, ce sont les premières à disparaître.

La restauration de prairies riches en *Fabaceae* (particulièrement *T. pratense*) semblerait être la stratégie la plus efficace pour la conservation de beaucoup d'espèces de bourdon menacées (**figure 17**) (Goulson *et al.*, 2005 ; Goulson, 2009 ; Redpath *et al.*, 2010). Les premiers résultats lors d'une augmentation de légumineuses semblent encourageants (Edwards & Williams, 2004). Des régimes de rotation en mosaïque sans utilisation d'insecticides ou d'engrais garantiraient un paysage agricole avec une haute biodiversité (Redpath *et al.*, 2010). Edwards (2000) a suggéré qu'une population de bourdons en bonne santé requiert au moins 10 km² d'habitat favorable. Pour *B. distinguendus*, aucune population de taille inférieure n'est connue en Grande-Bretagne. Enfin, les milieux ouverts sont à favoriser plutôt que les milieux boisés en raison des capacités d'accueil pour la nidification (Svensson *et al.*, 2000).



Figure 17 : « machair » à *T. pratense* en Ecosse (d'après Dawson, 2010).

1.5.2 Le cas de *Bombus subterraneus*

Sladen (1912) décrivait *B. subterraneus* comme une espèce commune, localement abondante et d'habitats diverses. Jusque la moitié du 20^{ème} siècle, on retrouvait *B. subterraneus* dans toute l'Europe jusqu'en Mongolie (Hoffer, 1882 ; Delmas, 1976). Toutefois, Hoffer (1882) la qualifiait de rare presque partout et Ball (1920) la qualifiait de peu répandue en Belgique. *B. subterraneus* décline actuellement en abondance à travers tous ses habitats natifs en Europe (Alford, 1975 ; Rasmont & Mersch, 1988 ; Rasmont *et al.*, 1993 ; Goulson & Hanley, 2004). *B. subterraneus* ne survit que dans des biotopes spécifiques restreints alors qu'il occupait une grande partie des biotopes (Goulson *et al.*, 2006). En Belgique, *B. subterraneus* est qualifié par Rasmont (1988) et Rasmont & Mersch (1988) comme en nette régression (abondance divisée par 3). La dernière récolte date de 1976 (Rasmont & Mersch, 1988) alors que l'espèce était présente en divers endroits de la Basse et Moyenne Belgique (Ball, 1914). Pauly & Rasmont (2010) le considèrent comme disparu de Belgique. Aux Pays-Bas, il est également considéré comme disparu avec une dernière récolte par Kunderberg en 1958 (Peeters & Reemer, 2003). Il est en danger en Allemagne (Martin, 1998). En Grande-Bretagne, alors que *Bombus subterraneus* était répandu dans tout le sud de l'île au début du 20^{ème} siècle, il a été vu pour la dernière fois à Dungeness, Kent, en 1988 et il est maintenant considéré comme disparu des îles britanniques (Sheppard & Edwards, 1999). *Bombus subterraneus* fait l'objet d'un Biodiversity Action Plan depuis la moitié des années 1990 et porte le statut de « nationalement menacé » (Sheppard & Edwards, 1999). *B. subterraneus* est protégé en Pologne et classé comme vulnérable (Kosior *et al.*, 2008).

B. subterraneus cumule deux facteurs de risque : elle est une espèce de pelouse sèche et n'est pas polylectique (Rasmont, in prep.). Goulson *et al.* (2005) renseignent *B. subterraneus* comme espèce spécialisée dans la récolte de pollen de *Fabaceae*.

Williams & Osborne (2009) affirment toutefois que *B. subterraneus* reste répandu hors de la Grande-Bretagne, avec beaucoup de récentes récoltes de la Suède à l'Iran et à la Mongolie. Ce bourdon reste en effet présent dans les Pyrénées-Orientales (Gosselin *et al.*, 2007 ; Iserbyt *et al.*, 2008, Iserbyt, 2009). Anagnostopoulos (2009) a collecté une reine de *B. subterraneus* dans la région montagnarde de Flórina en Grèce en 2006, alors que la dernière récolte remontait à 1966. Vers 1980, selon Pekkarinen *et al.* (1981), *B. subterraneus* aurait plutôt été en expansion en Finlande grâce à l'expansion de la culture de trèfle mais Söderman (1999) n'a retrouvé plus tard qu'un très faible nombre de *Bombus subterraneus*, indiquant alors une régression plus récente. Svensson *et al.* (2000) ont observé 10% de *Bombus subterraneus* sur l'ensemble des reines échantillonnées du 13 avril au 12 juin 1991 dans les plaines au

sud ouest d'Uppsala. L'abondance de *B. subterraneus* dans la région de Cracovie semble en légère expansion depuis la moitié du 19^{ème} siècle (Kosior *et al.*, 2008).

Pour améliorer le succès reproductif du trèfle des prés, 93 et 143 reines de quatre espèces (*B. hortorum* (L.), *B. ruderatus* (Fabricius), *B. terrestris* (L.) et *B. subterraneus* (L.)) originaires d'Angleterre ont été introduites en Nouvelle-Zélande en 1885 et 1906 (Farr, 1889 ; Hopkins, 1914 ; Sheppard, 2009). Cette première introduction d'insectes pour la pollinisation dans le monde fut un succès (Gurr, 1964 ; Macfarlane & Gurr, 1995). Actuellement, en Nouvelle-Zélande, *B. subterraneus* semble être réduit au voisinage des lacs de galets où la densité de plantes favorites est observée, notamment *Trifolium pratense* L. (Goulson & Hanley, 2004). Macfarlane & Gurr (1995) indiquent que *B. subterraneus* est réduit à l'intérieur des terres de l'Île Sud, principalement entre 180m et 820m. Gammans (com.pers.) affirme que *B. subterraneus* se porte bien en Nouvelle-Zélande. En Grande-Bretagne, *B. subterraneus* a été enregistré pour la dernière fois en 1988 et a été déclaré éteint de l'île en 2000 (Goulson, 2003 ; Edwards & Williams, 2004). Un programme d'élevage (BumbleBee Conservation Trust) a été lancé pour réintroduire *B. subterraneus* au Royaume-Uni à partir de reines de Nouvelle-Zélande (Howlett *et al.*, 2009). Ce programme prévoit un premier largage de reines néozélandaises en juin 2010 à Dungeness, endroit de la dernière récolte britannique (Gammans, in prep.). Selon Macfarlane & Griffith (com. pers.), 100-150 reines par saison sont nécessaires pour garantir une introduction dans des sites choisis. Des habitats riches en plantes préférées destinés à accueillir *Bombus subterraneus* ont été recréés par les restaurateurs (Howlett *et al.*, 2009).

1.5.3 Le cas de *Bombus distinguendus*

B. distinguendus est également une espèce en très forte régression dans toute son aire de distribution (Rasmont *et al.*, 1993 ; Goulson *et al.*, 2005). La dernière récolte en Belgique date de 1971 (Rasmont, 1988) alors que l'espèce était présente en divers endroits de la Basse et Moyenne Belgique (Ball, 1914). Ball (1920) qualifiait l'espèce de rare, mais plus répandue que *Bombus subterraneus*. En Belgique, depuis 1988 (Rasmont ; Rasmont & Mersch), *B. distinguendus* est qualifié comme en nette régression (abondance divisée par 3) et même éteint (Pauly & Rasmont, 2010). Aux Pays-Bas, l'espèce est classée par Peeters & Reemer (2003) comme sérieusement menacée (2 observations après 1970). L'espèce est également menacée d'extinction en Allemagne dû à l'intensification agricole (Martin, 1998 ; Oelschlägel, 2010). Selon (Martin, 1998), l'espèce demeure localement fréquente dans le nord de l'Allemagne et en Suède. En Grande-Bretagne, Goulson *et al.* (2005) affirment que *B. distinguendus* ne survit que dans des biotopes spécifiques rares alors qu'il occupait une grande partie des biotopes. Il n'est en effet présent qu'à de rares endroits au nord ouest de l'Écosse,

dans les Hébrides et les îles Orkney sur les bords de mer fertiles (« *machairs* ») et les dunes avoisinantes (**figure 18**) (Goulson *et al.*, 2005 ; Goulson *et al.*, 2006 ; Redpath *et al.*, 2010). *B. distinguendus* figure parmi les espèces les plus menacées de Grande-Bretagne (Williams *et al.*, 2007). Edwards (2000) cite ces grands *machairs* écossais comme leur dernier refuge britannique. Redpath *et al.* (2010) n'ont trouvé que 2 spécimens de *Bombus distinguendus* sur 246 bourdons échantillonnés durant l'été 2008 dans le nord-est de l'Ecosse, pourtant considéré comme un de leur dernier refuge. En Ecosse, en août 2009, Rasmont n'a collecté que 4 *B. distinguendus* sur 150 bourdons mâles récoltés dans l'extrême nord. *Bombus distinguendus* fait l'objet d'un Biodiversity Action Plan en Grande-Bretagne depuis la moitié des années 1990 et porte le statut de « nationalement menacé » (Sheppard & Edwards, 1999). Il est également en régression en Pologne et éteint dans la région de Cracovie (Kosior *et al.*, 2008).



Figure 18 : Distribution de *B. distinguendus* dans le nord de la Grande-Bretagne en novembre 2003 (d'après McDonald, non publié).

B. distinguendus est fortement inféodé aux légumineuses dont surtout *Trifolium pratense* (Rasmont, in prep. ; Edwards & Williams, 2004). Les préférences florales de *distinguendus* sont cohérentes avec l'hypothèse selon laquelle c'est la régression considérable des cultures de légumineuses qui est la principale cause de régression (Rasmont & Mersch, 1988). Plusieurs espèces en déclin présentent une distribution typiquement côtière, probablement dû au fait que ces biotopes sont moins soumis à des aménagements ou à l'intensification de l'agriculture (Goulson *et al.*, 2006). Bob Dawson (BBCT) centre ses actions sur le maintien, l'écologie et les exigences de *B. distinguendus* en Grande-Bretagne. En collaboration avec les fermiers, il établit des

habitats propices au développement de *B. distinguendus*. Ses observations menées durant l'été 2009 maintiennent l'espèce dans son statut « nationalement rare b » (entre 31 et 100 carrés de 10km occupés) (Dawson, 2010). *B. distinguendus* est protégé en Pologne et classé comme vulnérable (Kosior *et al.*, 2008).

1.5.4 Le cas de *Bombus melanurus*

Peu de données sont disponibles en matière de conservation pour *Bombus melanurus*. Malgré une distribution ouest-paléarctique étroite centrée sur la Turquie, l'Arménie et le nord de l'Iran, l'espèce ne semble pas menacée dans les stations où on l'a observée (Rasmont, in prep.). Sa préférence alpine lui permet d'échapper au morcèlement d'habitat d'origine anthropique.

1.5.5 Le cas de *Bombus fragrans*

Au contraire, en raison de son étroite sténotopie liée aux steppes, *B. fragrans* est une espèce fragile (Rasmont, in prep.). Alors qu'elle occupait un large territoire autrefois, l'espèce est devenue très rare en Europe (Rasmont *et al.*, 2005a). L'intensification de la culture réduit considérablement les milieux steppiques qu'elle fréquente. *B. fragrans* a été estimé par Williams & Osborne (2009) comme espèce vulnérable (IUCN) qui a subi un déclin substantiel en aire d'occurrence et en nombre d'enregistrements dans plus de 50% des observations depuis 1950. *Bombus fragrans* a également fait l'objet d'études en Autriche et Allemagne. En Basse-Autriche, on dénombrait jadis des centaines de spécimens, l'espèce n'était pas rare (Martin, 1998). La dernière récolte en Autriche date de 1967 (J. Neumayer). *B. fragrans* est déclaré éteint dans ce pays, les derniers spécimens ont été vus dans les années 80.

1.6 But

Les objectifs du présent travail consistent à :

- Décrire les phéromones sexuelles des mâles des quatre espèces étudiées, lesquelles ne sont pas encore connues.
- Définir la variabilité géographique à l'intérieur du sous-genre et des espèces.
- Vérifier le statut conspécifique des sous-espèces connues.
- Comparer les distances phénétiques obtenues aux inférences phylogénétiques disponibles dans la littérature.

2. Matériel et méthode

2.1 Collecte entomologique

80 spécimens ont été récoltés par Patrice Coppens, Thibaut De Meulemeester, Olivia Ponchau, Pierre Rasmont et Michaël Terzo à l'aide d'un filet à insecte ou d'un aspirateur à insecte. La détermination de chaque spécimen a été effectuée par le récolteur. Les taxons inclus dans la présente étude étant rares, leur échantillonnage a donc été basé sur les diverses missions organisées depuis plusieurs années par le laboratoire de zoologie de l'Université de Mons. Cette rareté a nécessité de nombreuses récoltes dans les zones étudiées. Les différentes stations sont représentées par espèce sur les **figures 19, 20, 21 et 22**. Les échantillons utilisés pour l'étude et leurs coordonnées sont repris dans la **table 1**.



Figure 19 : Stations de récolte de *B. subterraneus*. Numéros des stations : voir table 1. * : Stations 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20.

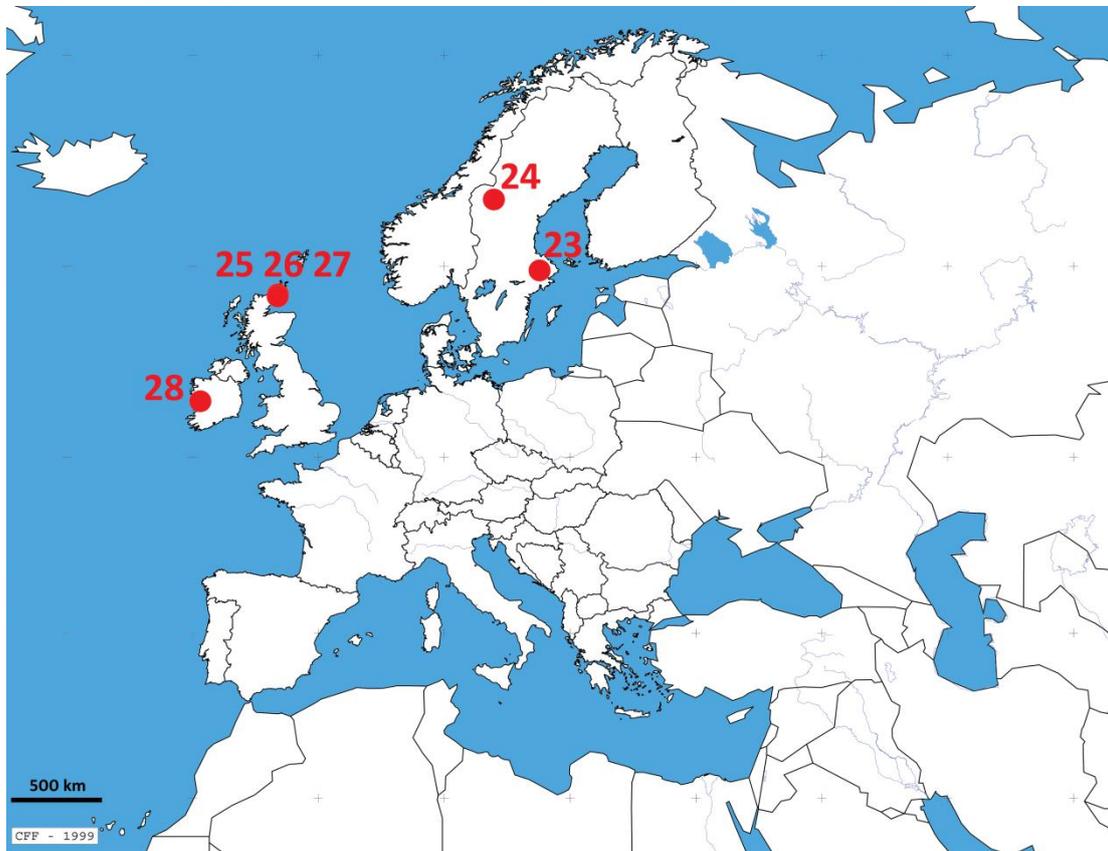


Figure 20 : Stations de récolte de *B. distinguendus*. Numéros des stations : voir table 1.



Figure 21 : Stations de récolte de *B. melanurus*. Numéros des stations : voir table 1.



Figure 22 : Stations de récolte de *B. fragrans*. Numéros de la station : voir table 1.

Table 1 : Echantillons utilisés pour l'analyse phéromonale.

Taxon	Récolteur(s)	Station	Echantillon	Origine	Coordonnées géographiques	Altitude	Date	Fleur butinée
<i>B. subterraneus subterraneus</i>	P. Rasmont	1	PR084, PR085	Suède, Uppsala län, Uppsala, Linnéträd gården	59°51'44"N 17°38'01"E	26m	08 VIII 2008	<i>Echinops sphaerocephalus</i>
		2	PR091, PR092	Suède, Uppsala län, Uppsala, Botaniska trädgården	59°51'05"N 17°37'40"E	24m	08 VIII 2008	<i>Stachys</i> sp.
<i>B. subterraneus liguriensis</i>	O. Ponchau	3	OP531, OP539	France, Hautes-Alpes, Guillestre	44°38'48"N 06°38'33"E	1223m	20 VIII 2005	<i>Trifolium pratense</i>
<i>B. subterraneus tectosagorum</i>	M. Terzo, aidé de P. Rasmont, S. Iserbyt et I. Vandenbergh	4	MT007	France, Pyrénées Orientales, Via, La Balladoza	42°28'50"N 02°02'25"E	1524m	15 VII 2001	<i>Echium vulgare</i>
		5	MT019, MT021, MT028, MT031, MT032, MT038, MT040, MT041	France, Pyrénées Orientales, Err, Les Fontanilles	42°25'08"N 02°03'12"E	1762m	16 VII 2001	<i>Trifolium pratense</i> , <i>Eryngium bourgatii</i> , <i>Epilobium angustifolium</i> , <i>Jasione montana</i>
		6	MT060, MT077	France, Pyrénées Orientales, Egat, Les Bergeries	42°30'33"N 02°01'14"E	1780	18 VII 2001	<i>Epilobium angustifolium</i>
		7	MT126, MT127, MT128, MT131, MT133, MT157	France, Pyrénées Orientales, Llo, Serra de Rohet	42°27'55"N 02°13'55"E	1583m	28 VII 2001	<i>Arenaria alpina</i>
		8	MT136	France, Pyrénées Orientales, Dorres, Els Tarters	42°28'42"N 01°55'08"E	1597m	27 VII 2001	<i>Stachys officinalis</i>
		9	MT137	France, Pyrénées Orientales, Eyne, Santa Maria de Belloc	42°28'47"N 02°04'28"E	1562m	27 VII 2001	<i>Ballota nigra</i>
		10	MT148	France, Pyrénées Orientales, Eyne, Orri de Baix	42°26'50"N 02°06'49"E	1991m	23 VII 2001	<i>Eryngium bourgatii</i>
		11	MT160, MT167, MT168	France, Pyrénées Orientales, Via, La Balladoza	42°28'50"N 02°02'25"E	1520m	28 VII 2001	<i>Centaurea scabiosa</i>
		12	MT171	France, Pyrénées Orientales, Via, La Balladoza	42°28'50"N 02°02'25"E	1520m	30 VII 2001	<i>Centaurea scabiosa</i>
		13	MT199	France, Pyrénées Orientales, Eyne, El Pla Del Bac	42°18'24"N 02°04'37"E	1630m	01 VIII 2001	<i>Centaurea scabiosa</i>
		14	MT207, MT210	France, Pyrénées Orientales, Eyne, El Port	42°28'37"N 02°02'20"E	1570m	01 VIII 2001	<i>Stachys officinalis</i>
		15	MT282	France, Pyrénées Orientales, Eyne, Menhir D33	42°29'13"N 02°05'21"E	1630m	29 VIII 2001	<i>Carduus</i> sp.
		16	MT334	France, Lozère, Les Salces,	44°35'06"N 03°06'35"E	1310m	01 IX 2001	<i>Cirsium eriophorum</i>

<i>B. subterraneus tectosagorum</i>	P. Coppens	17	PC055	Bonnecombe France, Pyrénées Orientales, Eyne, Port de Llo	42°46'71"N 02°07'40"E	1616m	09 VIII 2002	<i>Lotus corniculatus</i>
		18	PC086, PC093	France, Pyrénées Orientales, Err, Les Planes	42°39'00"N 02°08'26"E	1862m	10 VIII 2002	<i>Cirsium vulgare</i>
		19	PC122	France, Pyrénées Orientales, Eyne, El Port de Llo	42°46'67"N 02°07'47"E	1750m	10 VIII 2002	<i>Centaurea sp.</i>
		20	PC146	France, Pyrénées Orientales, Dorres, Belloc	42°47'63"N 01°93'40"E	1517m	15 VIII 2002	<i>Centaurea scabiosa</i>
<i>B. subterraneus latreillellus</i>	M. Terzo, aidé de P. Rasmont, Y. Barbier, H. Hines et M. Aytekin	21	MT659, MT662, MT664, MT667, MT668, MT669, MT670, MT673, MT674, MT675, MT676, MT678, MT681, MT682, MT683, MT684, MT685, MT686, MT687, MT688, MT689, MT690, MT694, MT695	Turquie, Artvin, Artvin, Yalnihçam geçidi	41°03'51"N 42°16'30"E	2510m	08 VIII 2002	<i>Stachys balansae</i>
	T. Demeulemeester, aidé de P. Rasmont et M. Aytekin	22	TD235, TD238	Turquie, Erzurum, Erzurum, Kireçli geçidi	40°21'04"N 41°41'50"E	2424m	10 VIII 2007	<i>Stachys sp.</i>
<i>B. distinguendus</i>	P. Rasmont	23	PR108	Suède, Uppsala län, Asplunda	59°47'28"N 17°34'46"E	9m	10 VIII 2008	<i>Trifolium pratense</i>
		24	PR144	Suède, Jämtland, Kvissle	63°16'32"N 13°56'32"E	312m	15 VIII 2008	<i>Epilobium angustifolium</i>
		25	PR314	Ecosse, Highland, Wick, Winless	58°28'27"N 03°13'44"O	15m	12 VIII 2009	<i>Cirsium arvense</i>
		26	PR332, PR333	Ecosse, Highland, Wick Winless	58°28'27"N 03°13'44"O	15m	12 VIII 2009	<i>Stachys palustris</i>
		27	PR364	Ecosse, Highland, Slickley	58°35'13"N 03°12'12"O	70m	13 VIII 2009	<i>Cirsium arvense</i>
	T. Demeulemeester	28	TD043	Irlande, Clare, Doolin, Ballyvoe	53°01'37"N 09°21'58"O	65m	27 VII 2009	<i>Rubus sp.</i>
<i>B. melanurus</i>	M. Terzo, aidé de P. Rasmont, Y. Barbier, H. Himes et M. Aytekin	29	MT742, MT743, MT748, MT749	Turquie, Ağrı, Ağrı, İpek Geçidi	39°36'20"N 43°41'34"E	2030m	11 VIII 2002	<i>Onopordum ps.</i>
	T. Demeulemeester	30	TD291	Turquie, Bayburt, Bayburt, Kop Geçidi	40°02'12"N 40°30'42"E	2441m	15 VIII 2007	<i>Cephalaria sp.</i>
<i>B. fragrans</i>	M. Terzo, aidé de P. Rasmont, Y. barbier, H. Himes et M. Aytekin	31	MT540, MT541	Turquie, Kayseri, Kayseri, entre İcili et Koçcağiz	38°32'12"N 35°44'38"E	1600m	04 VIII 2002	<i>Onopordum cf. macracanthum</i>

2.2 Analyse des sécrétions labiales céphaliques

2.2.1 Dissection

Les spécimens capturés sur le terrain ont été tués par congélation. Pour les échantillons de P. Coppins, O. Ponchau et M. Terzo, une incision a été effectuée autour de l'œil afin d'extraire les glandes labiales céphaliques (GLC) avec une fine pince. Les glandes ont été placées dans une fiole contenant 200 µl d'hexane. Pour les échantillons de P. Rasmont et T. Demeulemeester, la tête entière est sectionnée du corps et placée dans 400 µl d'hexane. Les molécules détectées sont identiques quand les seules GLC ou la tête entière sont placées dans l'hexane (Kullenberg *et al.*, 1973 ; Ågren *et al.*, 1979 ; De Meulemeester *et al.*, in prep.). Il faut également préciser que des composés identiques sont présents à la fois dans les sécrétions des glandes labiales et sur les objets marqués par les mâles (Kindl *et al.*, 1999). La fiole est conservée 24h à température ambiante pour permettre la diffusion des molécules dans le solvant. Elle est ensuite conservée dans un congélateur à -30°C jusqu'au moment de l'analyse.

2.2.2 Chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse

L'analyse des sécrétions labiales céphaliques a été effectuée à l'aide d'un chromatogramme en phase gazeuse (GC) (**figure 23**). Celui-ci est couplé à un spectromètre de masse (MS) pour permettre une identification des molécules phéromonales. La spectrométrie de masse peut donner la masse moléculaire d'un composé et la fragmentation moléculaire reflète sa structure (Jackson & Morgan, 1993).

Le GC-MS employé à l'Institut de Chimie Organique de Prague était un Finnigan GCQ et le spectromètre de masse est de type quadripôle. La colonne était une colonne apolaire *DS-5ms* (5% phenylmethylpolysiloxane de phase stationnaire ; 0,25µm d'épaisseur) de 30m de long. Le diamètre interne était de 0,25mm et le gaz utilisé est l'hélium avec une vitesse constante de 50cm/sec. Le GC-FID utilisé à l'Université de Mons était un GC-2010 Shimadzu avec détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne était une colonne capillaire apolaire *SLB-5ms* (5% diphenyl 95% dimethyl siloxane), de 30m de long sur 0,25mm de large avec une épaisseur de 0,25µm. Le gaz vecteur était l'hélium avec une vitesse constante de 50 cm/sec. La spectrométrie de masse permet l'identification des molécules alors que le GC-FID a une meilleure résolution dans la séparation des pics.

L'injection de l'échantillon a été effectuée manuellement à Prague et par injection automatique à Mons. La microsiringue nécessaire à l'injection a été rincée trois fois à l'hexane avant et après l'injection d'un microlitre de solution. Un blanc (hexane pur) a été effectué chaque jour au minimum pour s'assurer que la colonne était indemne de molécules contaminantes. L'hexane a été choisi comme solvant apolaire car il extrait un grand nombre de molécules des glandes labiales céphaliques (Terzo *et al.*, 2005). Il faut toutefois garder à l'esprit que ce solvant peut être sélectif vis-à-vis de certains composés (Jackson & Morgan, 1993).

Les échantillons MT021, MT028, MT031, MT032, MT038, MT040, MT041, MT060, MT540, MT541, MT742, MT743, MT748, MT749, MT282, MT334, MT668 et MT676 ont été analysés en GC-MS en décembre 2002 et en juillet-août 2005 par Michaël Terzo. Les échantillons TD235, TD238, TD291, PR084, PR085, PR091, PR092, PR108, PR144 et PR175 ont été analysés par Mathieu Quiniet et Audrey Coppée en décembre 2008 et par Pierre Rasmont en janvier 2009 et les échantillons MT282, MT334, MT668, MT676, TD471, PR364, PO531 et PO539 ont été injectés en janvier 2010 par Thomas Lecocq et Pierre Rasmont. Ces échantillons ont servi de référentiels pour l'identification des molécules.

Les injections GC et GC-MS ont été effectuées en mode « splitless ». Dans ce mode, la valve est fermée une minute à 220°C pour vaporiser, puis l'échantillon est envoyé dans la colonne. La totalité des échantillons repris dans la **table 1** ont été analysés en GC en décembre 2009.

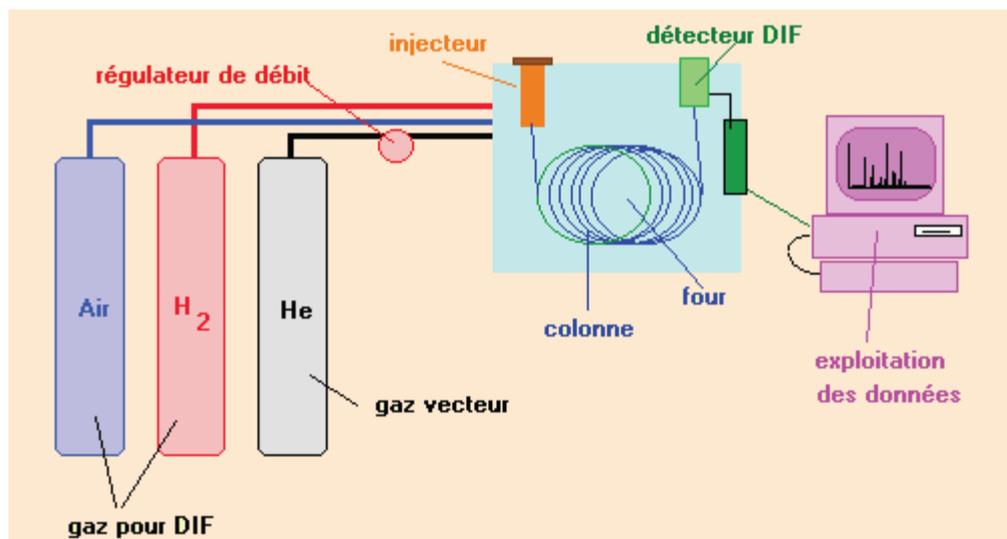


Figure 23 : Appareil de chromatographie en phase gazeuse muni d'un détecteur à ionisation de flamme. Avec un GC-MS, le détecteur est le MS et le seul gaz nécessaire est l'hélium (d'après Brunetto, 2007).

Le programme de températures suivi a été celui mis au point par Terzo *et al.* (2005) dans lequel l'échantillon est maintenu 2 minutes à 70°C, avec ensuite une augmentation constante de 10°C par minute jusque 320°C pour finir par 5 minutes à 320°C.

2.2.3 Traitement des chromatographes

Le logiciel qui a été utilisé pour analyser les composés moléculaires à l'aide du GC-MS était XCalibur 2.7. La librairie NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Montgomery, USA) a été consultée pour l'identification moléculaire. A Mons, l'intégration et l'analyse des pics a été effectuée grâce à GC-Solution (Shimadzu).

Le GC-FID ayant une meilleure résolution, l'intégration a été effectuée sur les chromatogrammes obtenus avec cet instrument (**figures 24 et 25**). Elle consistait à représenter sous forme d'un pourcentage l'abondance relative de chaque pic, et donc l'importance de chaque molécule dans la composition du bouquet phéromonal. Les paramètres d'intégration choisis étaient : Width : 5 sec ; Slope : 10000 $\mu\text{V}/\text{min}$; Drift : 0 $\mu\text{V}/\text{min}$; T.DBL : 1000 min ; Min Area/Height : 1000 counts.

Chaque intégration a ensuite été vérifiée manuellement. Dans certains cas (petits pics pas pris en compte, dédoublement d'intégration), des intégrations ont été faites manuellement.

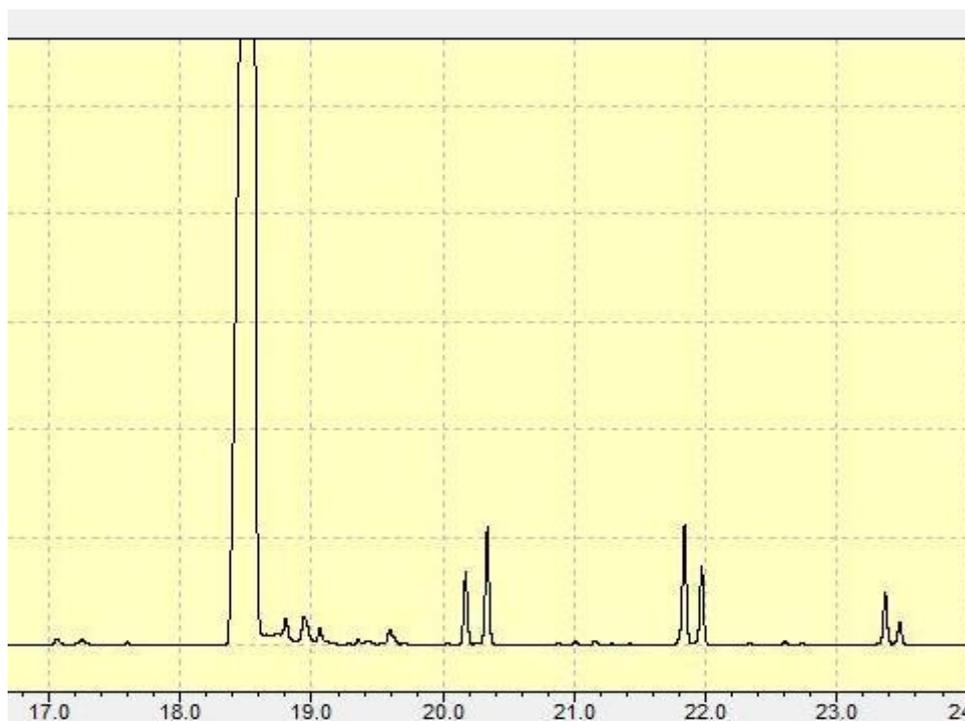


Figure 24 : Extrait du chromatogramme de l'échantillon *Bombus subterraneus* MT127.

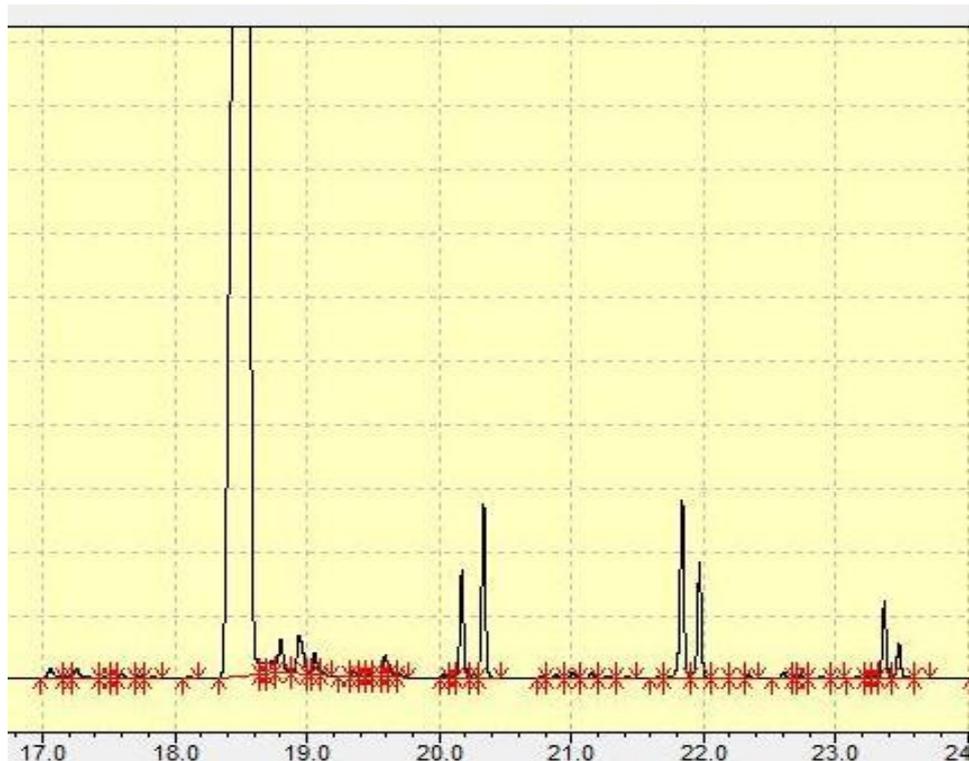


Figure 25 : Extrait du chromatogramme intégré de l'échantillon *Bombus subterraneus* MT127.

Une fois les chromatogrammes intégrés, la liste des temps de rétention ainsi que l'aire de chaque pic ont été transférées dans un fichier Excel. Les pics de même temps de rétention étaient alignés. Les pics dont l'aire était inférieure à 0,1% de l'aire totale chez tous les échantillons ont été rejetés car ils sont impossibles à dissocier du bruit de fond. Une fois alignés, un temps de rétention moyen a été calculé pour chaque pic.

Pour analyser la variabilité infraspécifique, les 4 matrices obtenues par espèce ont servi de base aux analyses statistiques. Pour mesurer la variabilité interspécifique, une matrice tridimensionnelle a été constituée par alignement des 4 matrices.

Les chromatogrammes obtenus par GC-FID ont été comparés aux chromatogrammes obtenus par GC-MS. Les pics détectés par le GC-FID mais absents sur le chromatogramme GC-MS étaient peu nombreux. Dans le cadre de vieux échantillons, il est probable qu'il s'agissait de molécules dégradées. Ces pics n'ont pas été pris en compte. A l'inverse, la quasi-totalité des pics détectés par GC-MS étaient comparables en GC-FID. Grâce aux spectres de masse et à la relation entre les deux appareils, chaque molécule a pu être identifiée.

2.2.4 Analyses statistiques

2.2.4.1 Méthode d'ordination

L'analyse en composantes principales (ACP) a permis de former des groupes sur base de la plus grande variance du jeu de données. Des ACP ont été réalisées sur base de la matrice générale et sur les matrices espèces. Dans le premier cas, ceci a permis de valider le statut des espèces étudiées. Dans le second cas, cela a permis de mesurer la variabilité géographique des sécrétions labiales céphaliques à l'intérieur d'une espèce. Chaque matrice a été transformée grâce à un logarithme en base 10 puis standardisée afin de minimiser la variation d'un composé entre les échantillons. L'ACP a ensuite été calculée à partir d'une matrice de corrélation issue de la matrice transformée et standardisée. Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel NTSys (version 2.1).

2.2.4.2 Méthode de groupement

Une classification hiérarchique a été réalisée afin de définir les groupes présentant les mêmes caractéristiques, et les relations entre ces groupes. Un dendrogramme par la méthode Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) a été construit sur base de la matrice de corrélation déjà établie. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel NTSys (version 2.1).

3. Résultats

3.1 Analyse des chromatogrammes

Les analyses effectuées à Prague et à Mons sont reprises dans la **table 2**.

Table 2 : Analyses effectuées, par espèce et par appareil de mesure.

	<i>B. subterraneus</i>	<i>B. distinguendus</i>	<i>B. melanurus</i>	<i>B. fragrans</i>
GC-MS	21	5	5	2
GC-FID	66	7	5	2

L'identification des molécules des sécrétions céphaliques s'effectue sur base du chromatogramme GC-MS et l'intégration a lieu sur le chromatogramme GC-FID. Une comparaison de ces deux graphes est présentée pour chaque espèce.

3.1.1 Le sous-genre *Subterraneobombus*

A la première vue des 4 chromatogrammes (**figure 26**), il est possible de différencier les 4 espèces. La composition des sécrétions labiales céphaliques de *Bombus distinguendus* semble fort proche de *Bombus melanurus* alors que *Bombus subterraneus* et *Bombus fragrans* semblent plus isolés. Les composés qui sortent après un temps de rétention de 20 minutes sont pratiquement similaires pour les quatre espèces.

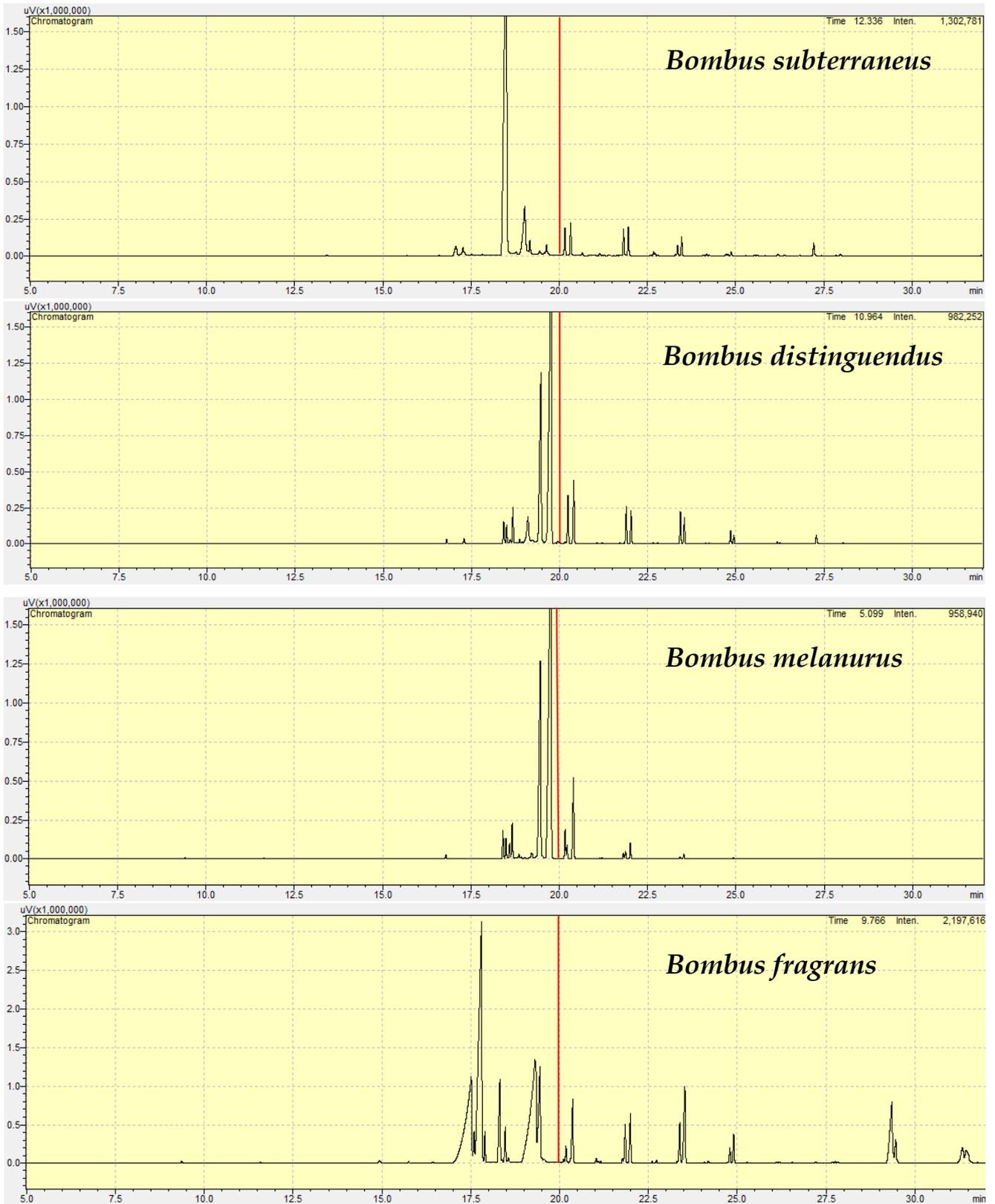


Figure 26 : Chromatogrammes GC-FID des 4 espèces étudiées. Dans l'ordre : *Bombus subterraneus* (échantillon PR084), *Bombus distinguendus* (échantillon PR332), *Bombus melanurus* (échantillon TD291), *Bombus fragrans* (échantillon MT541). Trait rouge : temps de rétention de 20 min.

3.1.2 *Bombus subterraneus*

Le profil des chromatogrammes analysés avec le GC-MS et le GC-FID est quasiment identique (**figures 27 et 28**). L'échantillon ne semble pas s'être dégradé durant les 3 années séparant les deux analyses.

33 molécules ont été détectées chez *Bombus subterraneus* (**table 3**). Sur ces 33 molécules, 29 ont été identifiées. Chez tous les échantillons, le geranyl citronellal constitue la molécule majeure (~85% de l'aire totale). Après un temps de rétention de 20 minutes, les principales molécules observées sont des alcènes suivis des alcanes à même nombre de carbone. Ainsi, le tricosène (1,2% de l'aire totale ; 20,17 RT) sort avant le tricosane (2,6% de l'air totale ; 20,34 RT) et le pentacosène (1,9% de l'aire totale ; 21,83 RT) est suivi du pentacosane (1,9% de l'aire totale ; 21,97 RT). Ces 5 molécules représentent plus de 90% de l'aire totale.

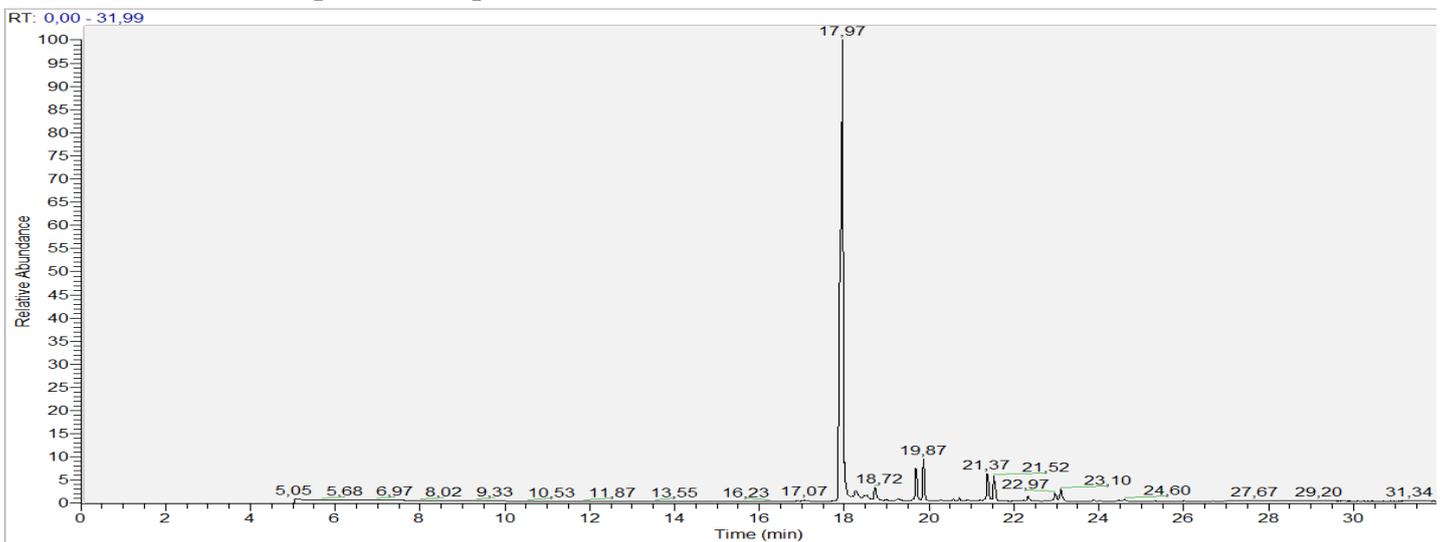


Figure 27 : Chromatogramme GC-MS de *Bombus subterraneus* (échantillon PR084).

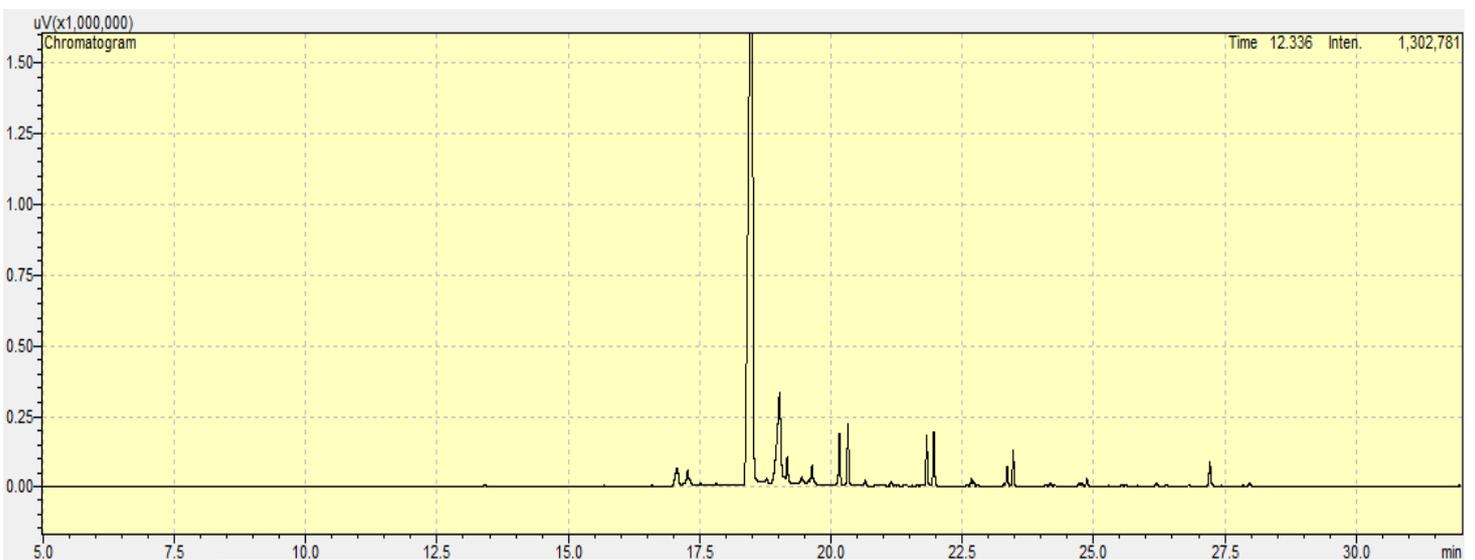


Figure 28 : Chromatogramme GC-FID de *Bombus subterraneus* (échantillon PR084).

Table 3 : Molécules détectées dans les sécrétions labiales céphaliques de *B. subterraneus* (n=66). RT = temps de rétention, Min = Minimum, D1 = 1er décile, Med = Médiane, D9 = 9ème décile, Max = Maximum. En gras : Molécules dont l'abondance relative médiane > 1%. X : Molécule non identifiée.

RT	Composé	Min	D1	Med	D9	Max
17,10	X1	0,00	0,05	0,36	1,34	3,38
17,28	X2	0,00	0,08	0,47	1,49	4,25
17,59	Octadecenal	0,00	0,02	0,06	0,11	0,22
18,22	Henicosène	0,00	0,00	0,00	0,05	0,52
18,57	Geranylcitronnellal	21,64	65,82	82,45	88,62	92,68
18,65	Henicosane	0,00	0,00	0,19	0,24	0,92
18,74	Geranylcitronnellal	0,00	0,16	0,22	0,31	0,61
18,82	Geranylcitronnellal	0,00	0,30	0,40	0,63	2,08
18,97	Geranylcitronnellal	0,37	0,62	1,78	8,26	25,33
19,36	Docosène	0,00	0,04	0,08	0,14	0,62
19,42	Docosane	0,00	0,00	0,06	0,41	1,20
19,46	Docosane	0,00	0,00	0,08	0,24	1,32
19,59	Geranylgeraniol ou geranylcitronnellol	0,00	0,12	0,21	0,60	2,79
19,63	Geranylgeraniol ou geranylcitronnellol	0,00	0,00	0,29	0,68	1,43
20,17	Tricosène	0,42	0,77	1,18	2,39	8,83
20,34	Tricosane	0,84	1,83	2,64	4,72	13,44
21,00	Tetracosène	0,02	0,04	0,05	0,11	0,22
21,16	Tetracosane	0,03	0,07	0,11	0,21	0,68
21,83	Pentacosène	0,62	1,32	1,86	3,39	6,07
21,92	Pentacosène+Pentacosane	0,00	0,00	0,00	0,06	0,09
21,97	Pentacosane	0,48	1,32	1,87	3,10	7,21
22,60	Hexacosène	0,00	0,04	0,07	0,16	0,59
22,68	Hexacosane	0,00	0,00	0,06	0,21	0,31
22,72	Hexacosane	0,01	0,04	0,06	0,11	0,31
23,37	Heptacosène	0,11	0,45	0,85	1,40	2,94
23,47	Heptacosane	0,10	0,35	0,71	1,30	5,68
24,10	Octacosène	0,00	0,03	0,06	0,20	0,28
24,18	Octacosane	0,00	0,01	0,03	0,06	0,14
24,78	Nonacosène	0,01	0,08	0,16	0,30	0,59
24,88	Nonacosane	0,01	0,05	0,12	0,24	0,93
26,20	Hentriacosène	0,00	0,00	0,02	0,08	0,35
27,21	X3	0,00	0,01	0,13	0,73	1,86
27,97	X4	0,00	0,02	0,06	0,20	0,56

3.1.3 *Bombus distinguendus*

Comme pour *Bombus subterraneus*, les chromatogrammes de *Bombus distinguendus* en GC-MS et en GC-FID sont similaires (figures 29 et 30). Ces deux analyses ont été réalisées dans un intervalle de temps court et peu de temps après la récolte de l'échantillon.

Chez *Bombus distinguendus*, 31 molécules ont été détectées, dont 28 ont été identifiées (table 4). La molécule majeure est le geranylgeranial, présent en différents isomères. Après 20 minutes de passage, une succession d'alcènes et d'alcane sont également observés. Au plus la chaîne carbonée est longue, au moins les acides gras dérivés sont abondants.

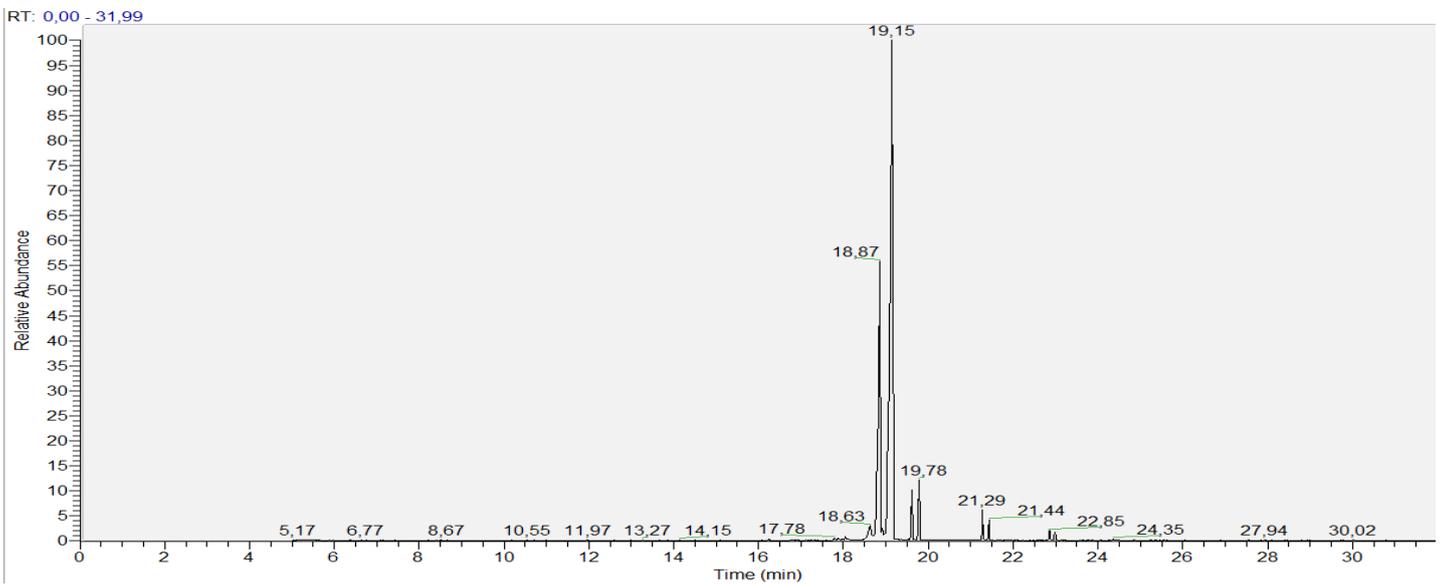


Figure 29 : Chromatogramme GC-MS de *Bombus distinguendus* (échantillon PR332).

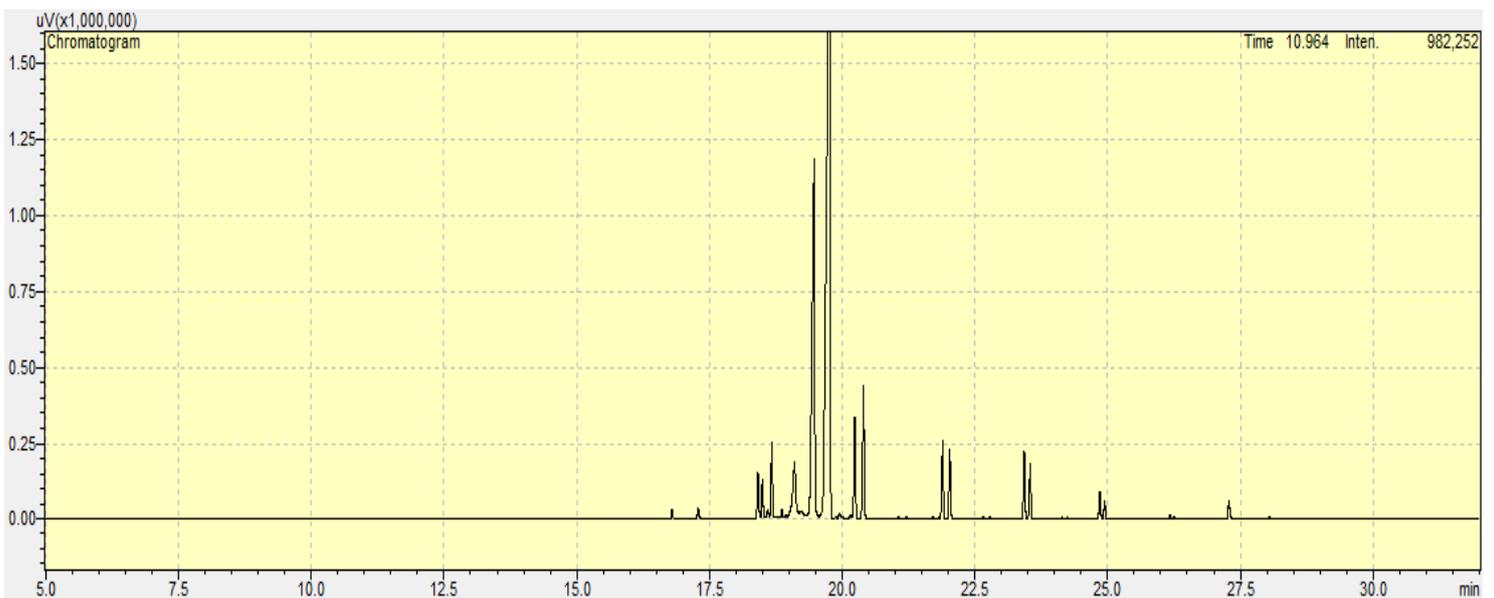


Figure 30 : Chromatogramme GC-FID de *Bombus distinguendus* (échantillon PR332).

Table 4 : Molécules détectées dans les sécrétions labiales céphaliques de *B. distinguendus* (n=7). RT = temps de rétention, Min = Minimum, Med = Médiane, Max = Maximum. En gras : Molécules dont l'abondance relative médiane > 1%. X : Molécule non identifiée.

RT	Composé	Min	Med	Max
16,79	Farnésyl acétone	0,08	0,21	0,29
17,36	X1	0,00	0,00	1,00
17,57	X2	0,00	0,01	1,39
18,42	Henicosène	1,48	1,91	2,49
18,49	Geranylgeranial	0,80	1,07	1,56
18,60	Henicosane	0,37	0,56	0,92
18,67	Geranylgeranial	1,13	1,71	2,70
18,86	Geranylgeranial	0,22	0,32	0,44
18,93	Geranylgeranial	0,11	0,14	0,20
19,11	Geranylgeranial	0,00	1,23	4,46
19,26	Geranylgeranial	0,00	0,32	18,77
19,48	Geranylgeranial	12,69	16,38	20,97
19,53	Geranylgeranial	0,00	0,27	1,04
19,80	Geranylgeranial	38,01	48,32	68,28
20,25	Tricosène	2,08	2,79	4,73
20,42	Tricosane	2,67	4,91	11,55
21,06	Tetracosène	0,05	0,07	0,10
21,21	Tetracosane	0,04	0,09	0,20
21,89	Pentacosène	1,18	1,87	2,71
22,03	Pentacosane	0,73	2,28	5,44
22,66	Hexacosène	0,04	0,07	0,11
22,78	Hexacosane	0,03	0,08	0,19
23,42	Heptacosène	0,44	1,12	2,33
23,54	Heptacosane	0,28	1,47	3,48
24,14	Octacosène	0,00	0,04	0,07
24,24	Octacosane	0,01	0,04	0,08
24,84	Nonacosène	0,14	0,30	0,93
24,94	Nonacosane	0,04	0,47	0,96
26,17	Hentriacosène	0,01	0,05	0,15
26,25	Hentriacosane	0,01	0,05	0,10
28,04	X3	0,01	0,06	0,12

3.1.4 *Bombus melanurus*

Les chromatogrammes de *Bombus melanurus* en GC-MS et en GC-FID sont d'apparences très proches (**figures 31 et 32**). L'analyse GC-MS ayant été faite sur du matériel bien conservé, nous pouvons considérer que l'échantillon était de bonne qualité au moment de l'analyse GC-FID.

Les chromatogrammes de *Bombus melanurus* ont révélé 40 composés. 39 de ces molécules ont été identifiées et le géranylgeranial, présent en deux principaux pics, est le composé majeur (**table 5**). La même suite d'alcènes et d'alcane que chez *Bombus subterraneus* et *Bombus distinguendus* sont observés après un temps de rétention de 20 minutes, mais en abondance supérieure

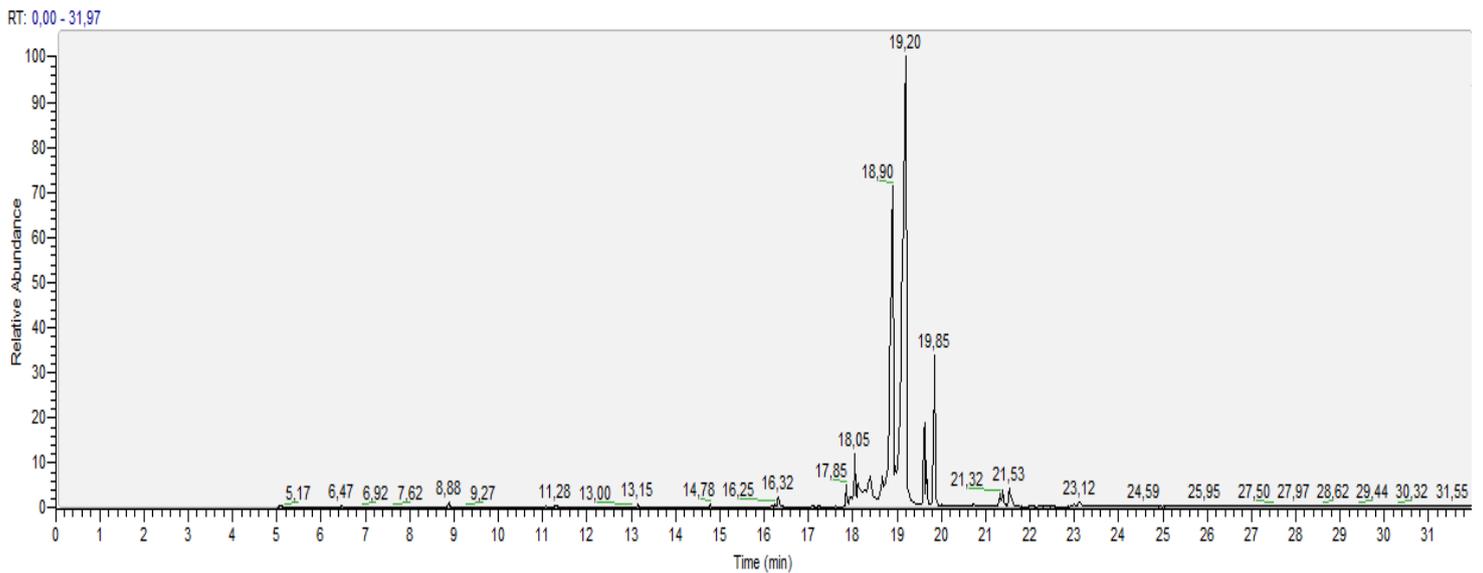


Figure 31 : Chromatogramme GC-MS de *Bombus melanurus* (échantillon TD291).

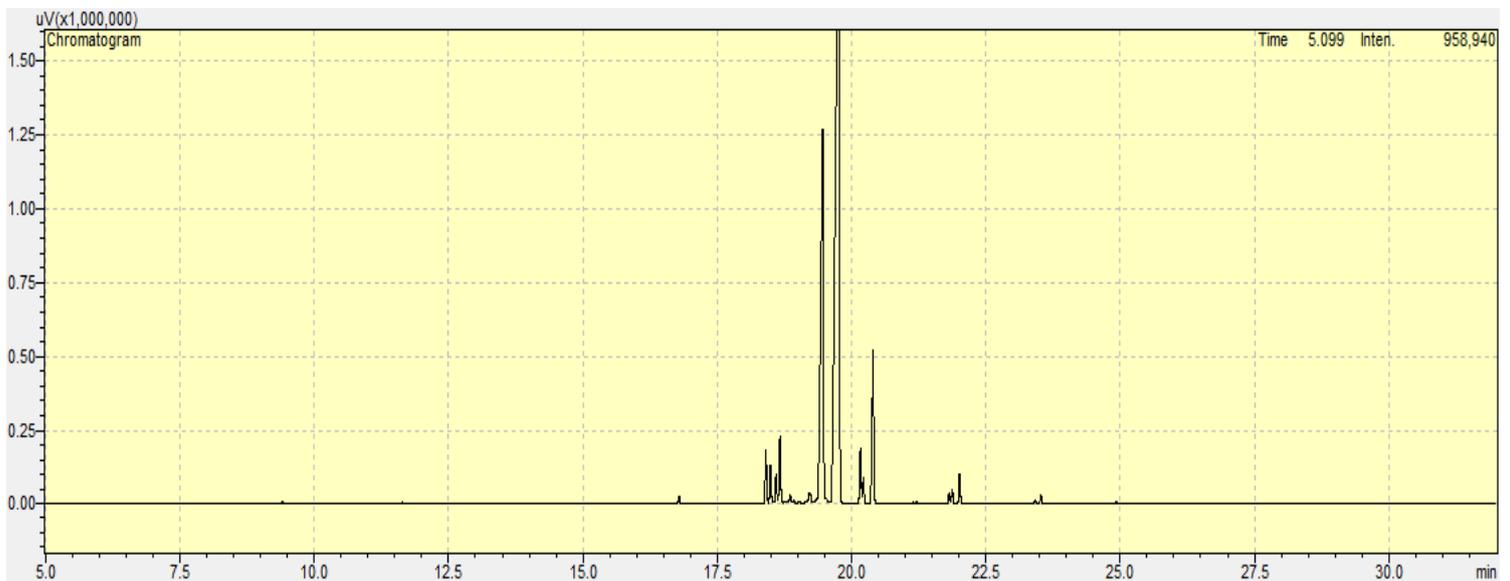


Figure 32 : Chromatogramme GC-FID de *Bombus melanurus* (échantillon TD291).

Table 5 : Molécules détectées dans les sécrétions labiales céphaliques de *B. melanurus* (n=5). RT = temps de rétention, Min = Minimum, Med = Médiane, Max = Maximum. En gras : Molécules dont l'abondance relative médiane > 1%. X : Molécule non identifiée.

RT	Composé	Min	Med	Max
16,74	Farnésyl acétone	0,22	0,34	2,83
17,29	Ethyl hexadecenoate	0,00	0,06	0,14
17,46	Hexadecenyl acetate	0,01	0,03	0,17
17,52	Ethyl hexadecanoate	0,00	0,06	0,07
18,36	Henicosène	1,87	2,31	3,03
18,45	Geranylgeranial	1,00	1,32	1,42
18,55	Henicosane	0,66	0,81	1,89
18,63	Geranylgeranial	1,41	2,33	2,53
18,80	Geranylgeranial	0,19	0,29	0,43
18,88	Geranylgeranial	0,12	0,17	0,23
19,00	Geranylgeranial	0,00	0,47	5,48
19,17	Geranylgeranial	0,82	1,22	3,24
19,26	Geranylgeranial	0,00	0,37	1,05
19,42	Geranylgeranial	11,37	22,54	24,24
19,48	Geranylgeranial	0,00	0,40	0,63
19,67	Geranylgeranial	19,04	43,18	55,32
20,16	Tricosène	2,00	3,93	7,45
20,22	Tricosène	0,87	2,33	4,14
20,38	Tricosane	5,97	6,11	16,64
20,94	Tetracosène	0,04	0,07	0,31
21,00	Tetracosène	0,03	0,06	0,26
21,10	Tetracosane	0,02	0,12	0,63
21,15	Tetracosane	0,07	0,10	0,25
21,78	Pentacosène	0,41	0,88	1,53
21,84	Pentacosène	0,54	1,72	3,20
21,97	Pentacosane	1,07	1,61	5,05
22,60	Hexacosène	0,05	0,08	0,10
22,72	Hexacosane	0,00	0,05	0,18
23,30	Heptacosène	0,04	0,16	0,27
23,36	Heptacosène	0,17	0,77	1,24
23,47	Heptacosane	0,32	0,53	1,86
24,10	Octacosène	0,03	0,05	0,09
24,26	Octacosane	0,00	0,04	0,07
24,73	Nonacosène	0,01	0,05	0,12
24,78	Nonacosène	0,03	0,22	0,54
24,88	Nonacosane	0,07	0,12	0,54
26,07	Triacosène	0,02	0,03	0,13
26,12	Triacosène	0,00	0,04	0,08
26,19	Triacosane	0,01	0,01	0,08
27,21	X1	0,03	0,03	1,25

3.1.5 *Bombus fragrans*

Contrairement aux 3 premières espèces étudiées, les chromatogrammes GC-MS et GC-FID de *Bombus fragrans* ne sont pas parfaitement similaires avant un temps de rétention de 20 minutes (**figures 33 et 34**). A la vue des deux graphes, l'abondance relative des premiers composés majeurs semble différente. Nous émettons l'hypothèse que l'échantillon récolté en 2002, analysé en GC-MS en 2002 a subi des dégradations avant son analyse GC-FID en 2009.

32 composés moléculaires sont détectés dans les sécrétions labiales de *Bombus fragrans*. 27 composés ont été identifiés (**table 6**). Les composés principaux sont l'octadécadiénal, l'octadécenal et l'octadécenyl acétate avec respectivement des abondances médianes de 19%, 24% et 23%. Contrairement aux 3 autres espèces étudiées, *Bombus fragrans* sécrète des dérivés d'acide gras comme composés moléculaires principaux et non des polymères d'isoprène. Enfin, des alcènes et alcanes à 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 29 carbones sont sécrétés en quantités non négligeables, ce qui semble être caractéristique des 4 espèces étudiées.

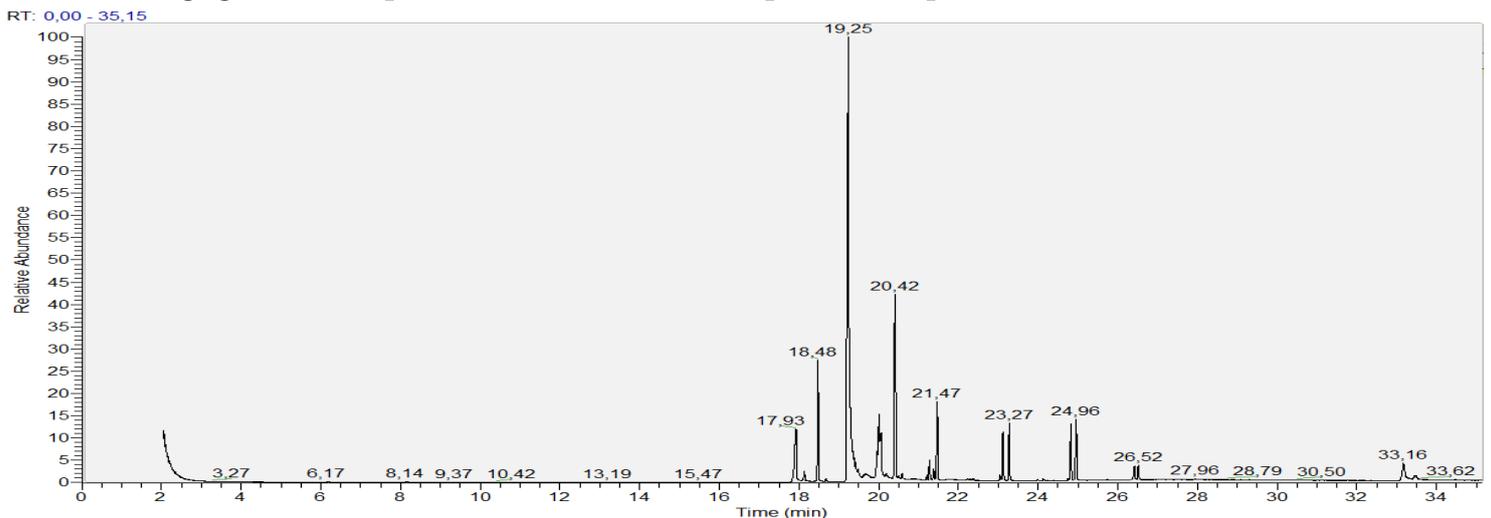


Figure 33 : Chromatogramme GC-MS de *Bombus fragrans* (échantillon MT541).

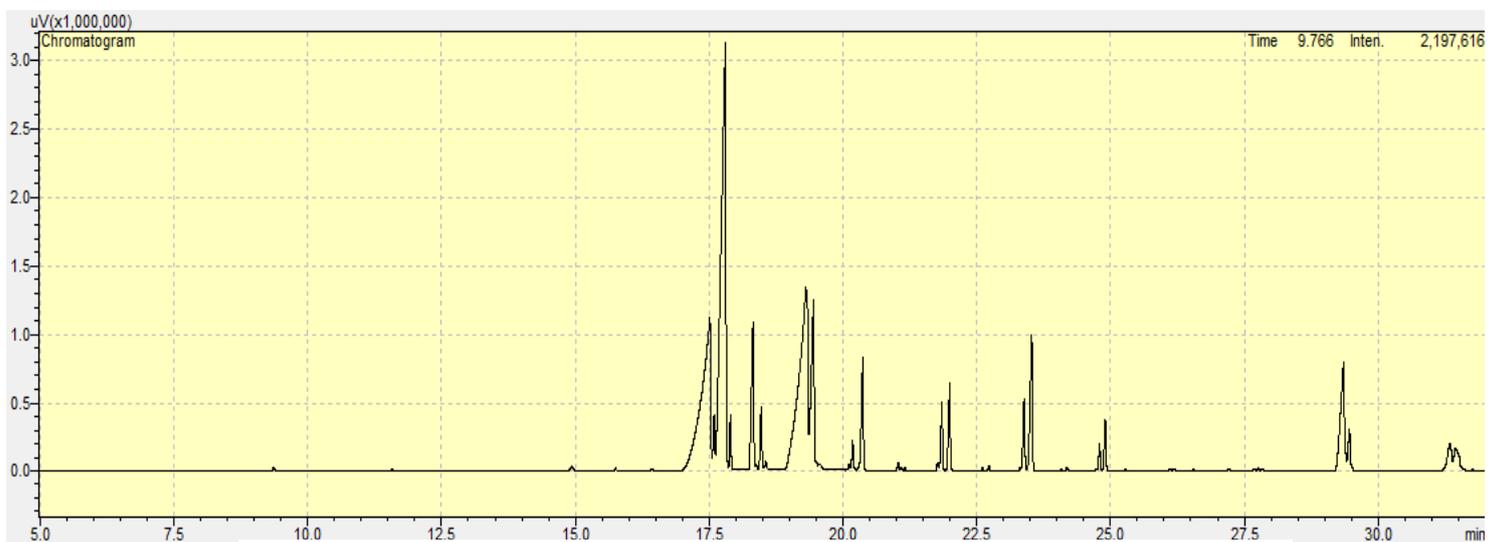


Figure 34 : Chromatogramme GC-FID de *Bombus fragrans* (échantillon MT541).

Table 6 : Molécules détectées et pourcentage de l'aire des sécrétions labiales céphaliques de *B. fragrans* (n=2). RT = temps de rétention. En gras : Molécules dont l'abondance relative médiane > 1%. X : Molécule non identifiée.

RT	Composé	MT540	MT541
17,42	Octadecadienal	18,60	18,54
17,50	Ac. Hexadecanoïque	3,30	1,25
17,75	Octadecenal	20,45	26,97
17,86	Octadecanal	0,45	0,94
18,27	Octadecenol	1,26	4,47
18,37	X1	0,10	0,13
18,45	Octadecanol	0,17	1,42
18,54	X2	0,31	0,22
19,26	Octadecenyl acétate	27,45	18,51
19,28	Octadecenyl acétate	5,03	3,40
19,42	Octadecyl acétate	4,85	6,83
19,47	X3	0,27	0,21
19,55	X4	0,45	0,32
19,85	X5	0,27	0,05
20,11	Tricosène	0,23	0,15
20,17	Tricosène	0,60	0,62
20,35	Tricosane	3,22	2,98
21,03	Tetracosène	0,21	0,18
21,09	Tetracosane	0,06	0,08
21,77	Pentacosène	0,26	0,19
21,84	Pentacosène	1,54	1,59
21,98	Pentacosane	2,45	2,20
22,60	Hexacosène	0,06	0,07
22,72	Hexacosane	0,11	0,11
23,30	Heptacosène	0,09	0,08
23,37	Heptacosène	1,40	1,74
23,50	Heptacosane	3,63	4,07
24,09	Octacosène	0,06	0,04
24,18	Octacosane	0,08	0,08
24,79	Nonacosène	0,44	0,58
24,89	Nonacosane	1,22	1,18
26,19	Henitricosane	0,09	0,04

3.2 Analyses statistiques

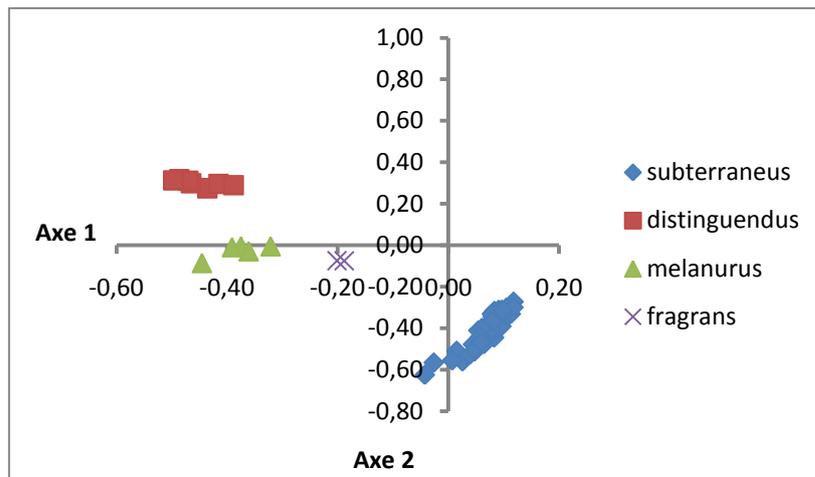
3.2.1 Du niveau interspécifique

Après alignement des 4 matrices espèce les unes avec les autres, une matrice totale de 80 échantillons objets et de 112 composés moléculaires descripteurs est formée. Cette matrice transformée (logarithme en base 10) et standardisée a servi de base à une matrice de corrélation, sur laquelle une ACP est réalisée (**figure 35**).

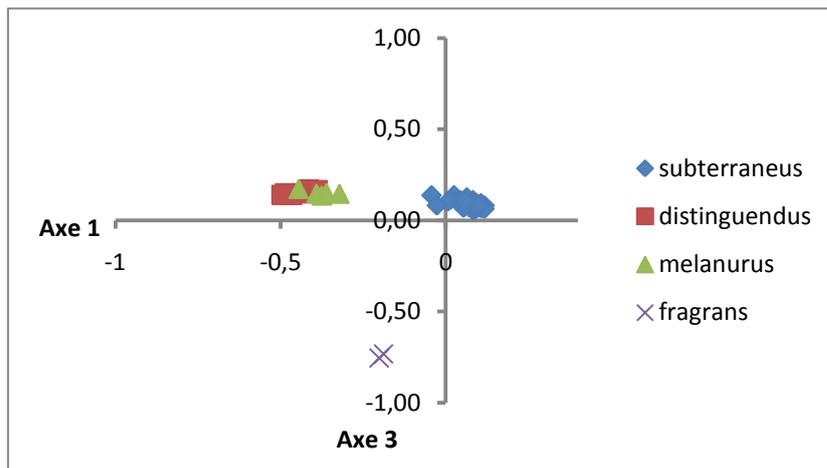
La **figure 35** montre que les 4 espèces étudiées peuvent être parfaitement séparées sur base des relations entre les 3 axes présentant la plus grande variance. Ces 3 axes représentent 28%, 18% et 12% soit 58% de la variance. L'axe 1 isole *Bombus subterraneus* et *Bombus fragrans* et l'axe 2 sépare *bombus distinguendus* de *Bombus melanurus*. Les axes 1 et 3 ne peuvent séparer *Bombus distinguendus* de *Bombus melanurus*. Les relations entre l'axe 4 et les 3 premiers axes révèlent également les 4 espèces (non représentées). *Bombus subterraneus* est séparé des autres espèces grâce aux axes 1 et 2. *Bombus distinguendus* et *Bombus melanurus* sont isolés grâce à l'axe 2. Enfin, *Bombus fragrans* est mis en évidence grâce aux axes 1 et 3.

Un dendrogramme en lien complet (**figure 36**) est formé sur base d'une matrice euclidienne. Une nouvelle fois, les 4 espèces étudiées sont clairement isolées. Sur base de ce dendrogramme, *Bombus distinguendus* semble plus proche chimiquement de *Bombus melanurus* et *Bombus subterraneus* semble plus proche de *Bombus fragrans*.

ACP du sous-genre *Subterraneobombus* (Axes 1 et 2)



ACP du sous-genre *Subterraneobombus* (Axes 1 et 3)



ACP du sous-genre *Subterraneobombus* (Axes 2 et 3)

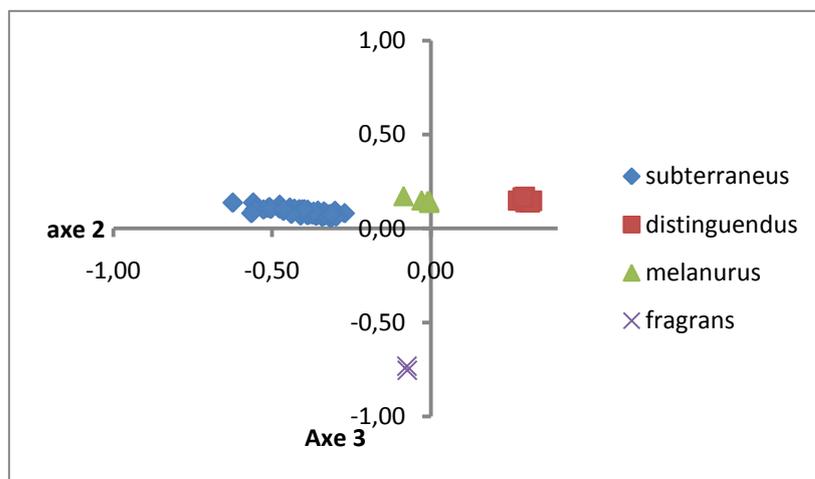


Figure 35 : Analyse en Composantes Principales du sous-genre *Subterraneobombus*. Positionnement des 80 échantillons par rapport aux 3 axes exprimant la plus grande variance.

3.2.2 Du niveau infraspécifique

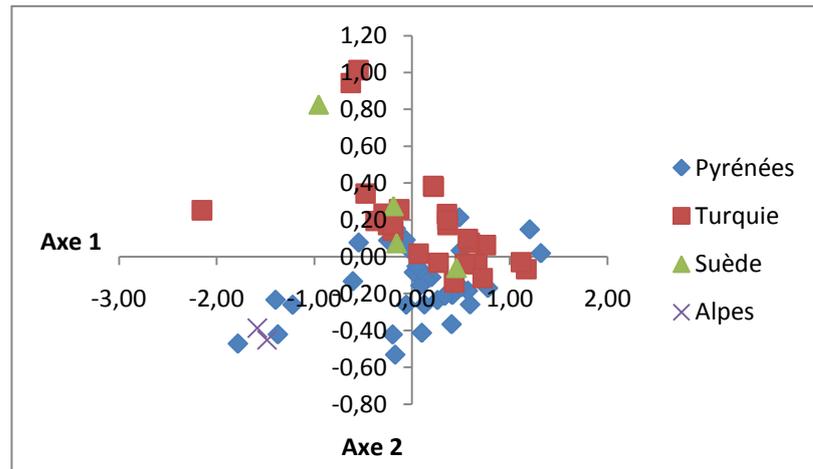
B. subterraneus est la seule espèce avec assez de données pour analyser la variabilité géographique. La matrice de *Bombus subterraneus* est composée de 66 échantillons objets et de 47 composés descripteurs. Cette matrice est transformée (logarithme en base 10) et standardisée, une matrice de corrélation est calculée et une ACP est réalisée (**figure 37**).

Les 3 premiers axes expriment respectivement 51%, 9% et 5% soit 65% de la variance totale. L'ACP de l'espèce *Bombus subterraneus* ne permet pas d'isoler clairement les différentes populations échantillonnées (**figure 37**). Nous pouvons cependant constater que les 2 échantillons des Alpes de la sous espèce *B. s. liguriensis* ont une composition phéromonale très proche des échantillons des Pyrénées de la sous espèce *B. s. tectosagorum* (rappel des sous espèces, **figure 4**). De la même manière, les échantillons suédois de la sous espèce *B. s. subterraneus* sont chimiquement proches des échantillons de Turquie de la sous espèce *B. s. latreillellus*. D'une manière générale, la combinaison des axes 1 et 2 et surtout des axes 2 et 3 sépare l'espèce *Bombus subterraneus* en deux groupes : les populations de Turquie et de Suède d'une part et les populations des Pyrénées et des Alpes d'autre part.

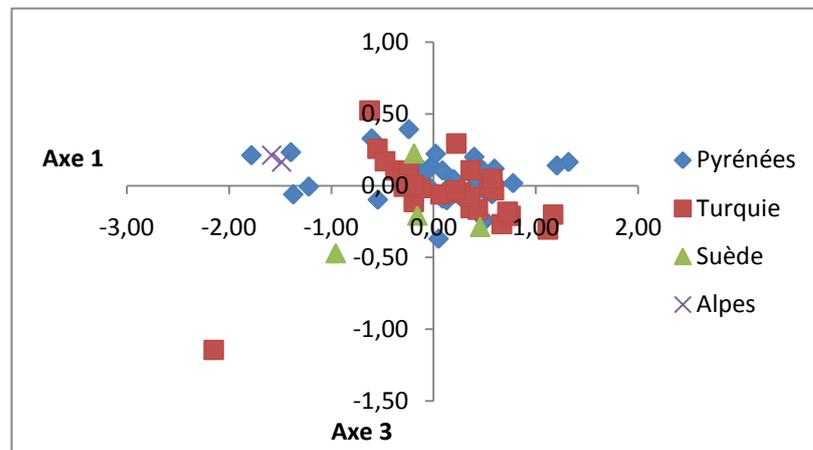
L'axe 1, qui exprime la moitié de la variance totale, ne permet pas de discriminer les échantillons. L'axe 2 et l'axe 3 pris individuellement permettent difficilement d'isoler les populations. Au contraire, la combinaison de ces 2 axes révèle clairement les deux groupes, même s'ils n'expriment que 14% de la variance totale.

Un dendrogramme en lien UPGMA est réalisé sur base de la matrice de corrélation (**figure 38**). Les différentes sous-espèces ne peuvent être isolées sur base de ce dendrogramme. La branche supérieure de l'arbre regroupe la majorité des échantillons des Pyrénées et les deux échantillons des Alpes. Ces deux populations sont rassemblées sur l'ACP et le dendrogramme. La branche inférieure regroupe en grande partie des échantillons de Turquie et la totalité des échantillons suédois. Ces deux sous-espèces sont également regroupées. La séparation des groupes Pyrénées-Alpes et Turquie-Suède n'est pas nette sur le dendrogramme. Il s'agit donc tout au plus d'une tendance.

ACP de *Bombus subterraneus* (Axes 1 et 2)



ACP de *Bombus subterraneus* (Axes 1 et 3)



ACP de *Bombus subterraneus* (Axes 2 et 3)

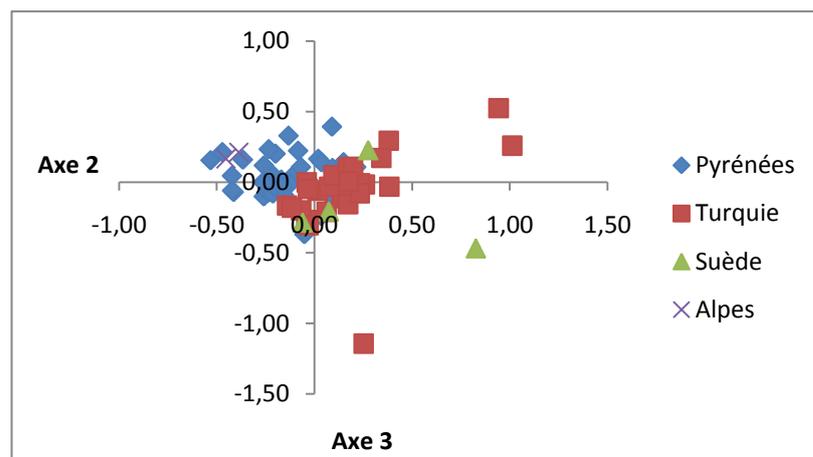


Figure 37 : Analyse en Composantes Principales de l'espèce *Bombus subterraneus*. Positionnement des 66 échantillons par rapport aux 3 axes exprimant la plus grande variance.

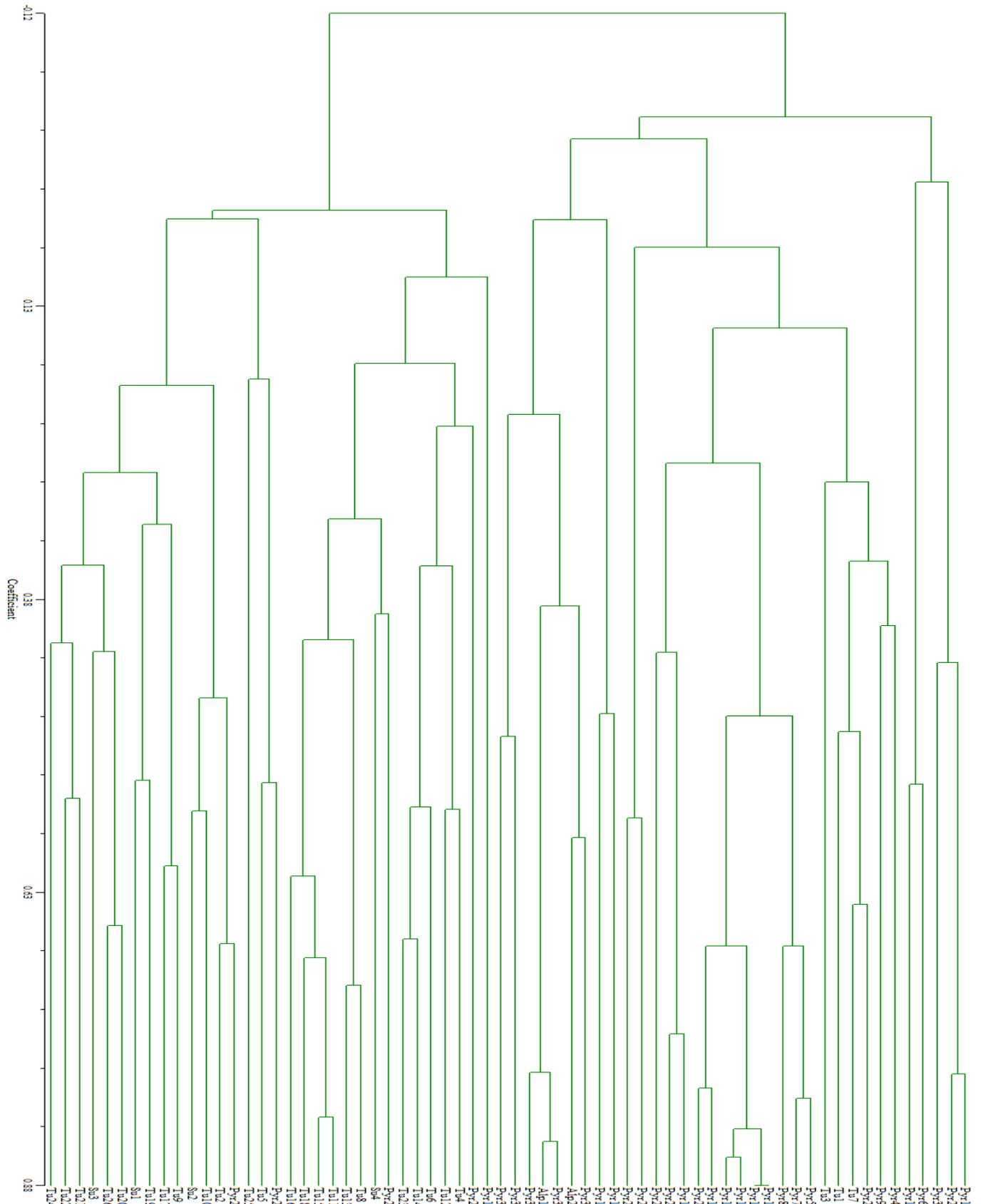


Figure 38 : Dendrogramme en lien UPGMA appliqué sur une matrice de corrélation des 66 échantillons de *Bombus subterraneus*.

3.3 Comparaison des distances chimiques avec les inférences phylogénétiques

Les proximités phéromonales entre les 4 espèces étudiées sont résumées et comparées à la phylogénie moléculaire de Hines (2008) (**figure 39**). Les caractères chimiques ne correspondent pas aux inférences phylogénétiques. Les compositions phéromonales proches de *B. distinguendus* et *B. melanurus* ne sont pas reflétées par la phylogénie.

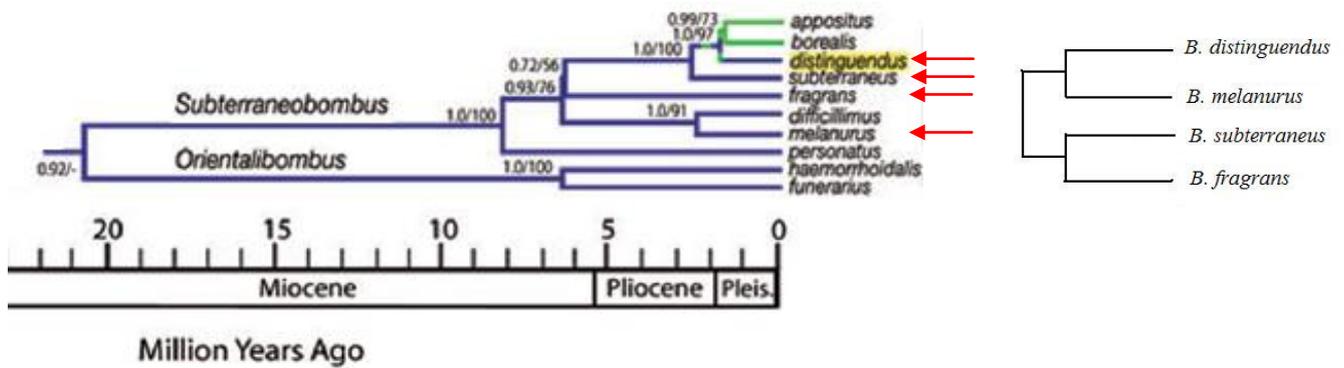


Figure 39 : Comparaison d'une partie du chronogramme de *Bombus* de Hines (2008) obtenu avec le r8s (à gauche) avec le dendrogramme schématisé résumé de la figure 36 du présent travail (à droite).

4. Discussion

4.1 Remarques préliminaires

Avant toute chose, il est important de rappeler que les *Subterraneobombus* sont des bourdons rares et que le présent travail a été effectué sur base d'un matériel peu abondant. Excepté pour *Bombus subterraneus* (66 échantillons de diverses régions), les 3 autres espèces ouest-paléarctique sont très peu représentées. Les échantillons de *Bombus distinguendus* proviennent de 2 localités en Suède, 1 en Ecosse et 1 en Irlande. Les échantillons de *Bombus melanurus* proviennent de 2 localités de Turquie et ceux de *Bombus fragrans* d'une seule localité en Turquie. Pour ces 3 taxons, le matériel était trop faible pour refléter la variabilité infraspécifique. Un jeu de donnée plus grand permettrait de meilleures observations.

Il faut également souligner que la présente étude se base uniquement sur les sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles pour définir les espèces. Même si ces sécrétions sont hautement spécifiques, d'autres signaux pourraient agir dans le SMRS des bourdons, comme par exemple des stimuli visuels ou des phéromones sexuelles femelles. Pour définir complètement le SMRS des bourdons étudiés, des études éthologiques de l'accouplement seraient utiles. L'électroantennographie permettrait également d'identifier les molécules actives qui déclenchent une réaction comportementale chez la femelle.

4.2 Composition phéromonale des 4 espèces étudiées

Pour la première fois, la composition des sécrétions labiales céphaliques de *B. subterraneus*, *B. distinguendus*, *B. melanurus* et *B. fragrans* est fournie. Les identifications coïncident avec les analyses de M. Terzo sur *B. subterraneus*, *B. melanurus* et *B. fragrans* (com. pers.). Les composés majeurs des 4 espèces sont renseignés et comparés dans la **table 7**.

Table 7 : Molécules majeures détectées dans les sécrétions labiales céphaliques des 4 espèces étudiées (% médian).

	<i>B. subterraneus</i>	<i>B. distinguendus</i>	<i>B. melanurus</i>	<i>B. fragrans</i>
octadecadienal				19
acide hexadecanoïque				2
octadecenal				24
octadecenol				3
hénicosène		2	2	
geranylgeranial		70	72	
geranylcitronnellal	85			
octadecenyl acetate				27
octadecyl acetate				6
tricosène	1	3	6	
tricosane	3	5	6	3
pentacosène	2	2	2	2
pentacosane	2	2	2	2

B. subterraneus et *B. fragrans* sont clairement identifiables sur base de leur composition phéromonale. *B. distinguendus* a une composition proche de celle de *B. melanurus*. Différents isomères sont suspectés dans les couples alcènes-alcanes pour les 4 espèces et pour le geranylgeranial chez *B. distinguendus* et *B. melanurus*.

Kullenberg *et al.* (1970) renseignent le geranylgeraniol comme seul composé phéromonal de *B. subterraneus*. Appelgren *et al.* (1991) documentent une composition de 100% de geranylcitronnellal pour *B. subterraneus* et une composition de 96% de geranylgeranial et 4% de geranylallinalool pour *B. distinguendus*. Sur base de l'analyse en phéromones de *B. subterraneus* et *B. distinguendus*, Appelgren *et al.* (1991) affirment qu'une grande quantité de diterpènes et pas de dérivés d'acides gras sont caractéristiques du sous-genre. Les résultats de Kullenberg *et al.* (1970) et d'Appelgren *et al.* (1991) ne coïncident pas avec ceux de la présente étude. Le geranylgeraniol n'est pas détecté dans la présente étude, mais plutôt le

geranylcitronnellal, un terpénoïde de même masse moléculaire (290) mais à fonction différente. Par ailleurs, contrairement à ce qu'affirment Appelgren *et al.* (1991), aucune sécrétion labiale céphalique de bourdon ne comprend qu'une seule molécule. De plus, des alcènes et des alcanes sont détectés dans les sécrétions labiales céphaliques des deux espèces. Les résultats de Kullenberg *et al.* (1970) et d'Appelgren *et al.* (1991) s'expliquent notamment par le fait que les auteurs désiraient mettre en évidence le caractère spécifique des phéromones des bourdons scandinaves et non la variabilité générale du bouquet. Par ailleurs, les performances du matériel disponible avant 1996 ne permettait guère de précision (Terzo *et al.*, 2005). Kullenberg *et al.* (1970) et Appelgren *et al.* (1991) se sont donc limités à la (aux) molécule(s) majeure(s).

Au sein d'espèces regroupées en sous-genres, les phéromones comportent de nombreux composés chimiques identiques ou dérivés l'un de l'autre (Terzo *et al.*, 2003). Dans le cas présent, les seuls composés communs aux 4 espèces étudiées sont les couples alcènes-alcanes observés après un temps de rétention de 20 minutes. Aucun composé majeur n'est commun aux 4 espèces étudiées, ce qui est très inhabituel (Bergström, 1981). Dans le sous-genre *Bombus*, l'éthyl dodécanoate est commun aux 5 taxons étudiés (*B. lucorum* « dark », *B. lucorum* « blond », *B. patagiatus*, *B. sporadicus* et *B. terrestris*) mais dans des proportions variables (Terzo *et al.*, 2003 ; Coppée, 2005). Pour *B. subterraneus*, *B. distinguendus* et *B. melanurus*, les composés majeurs sont des terpénoïdes proches qu'on peut qualifier de dérivés. Les dérivés diterpènes sont fréquents dans les sécrétions labiales céphaliques de bourdons. Pour *B. fragrans* toutefois, les composés majeurs sont des dérivés d'acide gras à 18 carbones. Aucun dérivé terpénique n'est présent. Cette espèce semble donc avoir subi une modification importante dans la formation des molécules phéromonales avec une spécification dans une autre voie de synthèse.

Chez *B. appositus*, une espèce néarctique du sous-genre *Subterraneobombus*, Hadley *et al.* (1981) renseignent le delta 7 tricosane, delta 7 pentacosane, delta 7 heptacosane et le delta 7 nonacosane comme composés phéromonaux. Ces alcanes sont également présents chez les 4 espèces étudiées ici mais pas comme composés dominants.

Pour le comportement pré-nuptial de patrouille et de perchoir, des marquages sont effectués (Žáček *et al.*, 2009). Pour le comportement d'attente à l'entrée du nid, aucun marquage n'a encore été observé. Les insectes présentant ce type de parade produisent des quantités particulièrement faibles de substances attractantes sexuelles (Phelan, 1997 ; Terzo *et al.*, 2007a ; Terzo *et al.*, 2007b). En comparant avec d'autres chromatogrammes de bourdon, nous constatons en effet que les 4 espèces étudiées présentent peu de grands pics sur leurs chromatogrammes et que ces pics

représentent un grand pourcentage de l'abondance relative totale. Chez d'autres espèces (*B. terrestris* et *B. pascuorum* par exemple), on dénombre souvent plus de pics d'abondance relative moindre. Une réduction des phéromones pourrait être le résultat d'une diminution de la pression sélective pour une grande quantité de phéromones excrétées.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que les analyses sont réalisées en concentration relative et non absolue. Nous ne pouvons donc pas conclure si les sécrétions sont diminuées ou non, même si le courant ionique mesuré à la fin de la colonne du chromatogramme était similaire à celui mesuré pour *B. terrestris* et *B. pascuorum*. De plus, certains auteurs (Krüger, 1951 ; Williams, 1991) ont observé des *Subterraneobombus* en comportement de marquage, ce qui suggère que les phéromones ont toujours un rôle dans la recherche de partenaires. Une quantification absolue permettrait de répondre à cette question.

Cette étude ainsi que celle de Terzo *et al.* (2007a) et celle de Terzo *et al.* (2007b) complètent le travail de comparaison de la composition des glandes labiales céphaliques de bourdon en fonction des stratégies de reproduction mené par Bertsch *et al.* (2005b).

Enfin, il se pourrait que *B. subterraneus* soit particulièrement attiré par le geranylcitronnellol, une molécule très proche du geranylcitronnellal, composé majeur des sécrétions labiales céphaliques des mâles. En effet, *B. subterraneus* est repris dans la liste de bourdons duppés par *Orchis paucifera*, et celle-ci sécrète une majorité de geranylcitronnellol (Valterová *et al.*, 2007).

4.3 Statut des espèces

4.3.1 Interspécificité

D'une manière claire, le statut taxonomique des 4 espèces étudiées est validé. Les 4 espèces sont isolées en utilisant des méthodes de groupement et d'ordination et les chromatogrammes sont spécifiques. Les données phéromonales valident la taxonomie établie sur base de la morphologie. D'après l'ACP et le dendrogramme, *Bombus distinguendus* a une composition phéromonale proche de *Bombus melanurus*. Les deux chromatogrammes et le tableau de composition sont d'ailleurs ressemblants.

4.3.2 Infraspécificité

B. subterraneus est la seule des 4 espèces récoltée en nombre dans différentes régions pour analyser la variabilité géographique. Les 4 sous-espèces décrites ne sont pas isolées en utilisant des méthodes de groupement et d'ordination. D'après le SMRS de Paterson (1985, 1993), ces 4 sous-espèces ne semblent pas en cours de spéciation. Deux tendances sont toutefois observables : un groupe composé des échantillons des sous-espèces *tectosagorum* (Pyrénées) et *liguriensis* (Alpes) et un groupe composé des échantillons des sous-espèces *subterraneus* (Suède) et *latreillellus* (Turquie). Cette séparation n'est toutefois pas nette et quelques échantillons sont groupés avec des populations différentes sur l'ACP et le dendrogramme.

Quelle que soit la méthode (ordination ou groupement), les 2 échantillons de la sous-espèce *liguriensis* sont toujours groupés avec des échantillons de la sous-espèce *tectosagorum*. Ces populations montagnardes semblent donc proches, malgré que 400km de plaines les séparent. Le sud du Massif Central constitue toutefois un îlot montagnard intermédiaire qu'il vaudrait la peine d'étudier. De la même manière, les 4 échantillons de la sous-espèce *subterraneus* sont toujours groupés avec des échantillons de la sous-espèce *latreillellus*. Le fait que ces deux populations soient proches chimiquement est plus étonnant en raison de la distance qui les sépare. Ces deux sous-espèces présentent peut-être un ancêtre commun plus récent qu'avec les autres populations. Nous observons donc pour l'espèce *B. subterraneus* une tendance Pyrénées-Alpes et une tendance Suède-Turquie.

L'échantillon MT334 prélevé en Lozère dans le Massif Central semble proche d'échantillons pyrénéens sur le dendrogramme et dans l'ACP. Ceci valide donc la distribution de *B. s. tectosagorum* présentée par Rasmont (1988) : Pyrénées et sud du

Massif Central.

Le statut subsppécifique de *B. s. tectosagorum* Kruseman (1958) est maintenu par la présente étude. L'isolement morphologique des populations des Pyrénées est conforté par une tendance à l'isolement phéromonal vis-à-vis de *B. s. latreillellus* de Turquie. Il semble donc préférable de maintenir le statut de la sous-espèce *tectosagorum*.

4.4 Comparaison des distances chimiques entre espèces avec les inférences phylogénétiques

Le dendrogramme des *Subterraneobombus* obtenu sur base d'une matrice de distance phéromonale euclidienne ne colle pas au chronogramme des *Subterraneobombus* obtenu par Hines (2008). Les relations phylogénétiques entre les espèces ne correspondent pas à la composition des sécrétions labiales céphaliques. Les compositions phéromonales proches de *B. distinguendus* et *B. melanurus* ne reflètent pas leur éloignement phylogénétique. De telles constatations avaient déjà été mises en évidence par Lecocq (2009). La taxonomie sur base du concept d'espèce de Paterson ne coïncide pas avec la phylogénie.

Au sein de *B. subterraneus*, le gène CO1 a servi de marqueur phylogénétique pour une population d'Allemagne et une population du Danemark mais ces localités n'ont pas été échantillonnées dans la présente étude.

4.5 Conservation des espèces

En comparant les distributions anciennes et les recensements actuels de la présente étude et de la littérature, il apparaît clairement qu'au moins *B. subterraneus*, *B. distinguendus* et *B. fragrans* sont en stricte régression en région ouest-paléarctique. Ces espèces sont menacées ou éteintes dans beaucoup de pays européens et peu de nouveaux enregistrements sont observés. Ces 3 espèces sont en régression dans la région ouest-paléarctique. Il semble que ce soit largement dû à leur spécialisation alimentaire sur des espèces florales d'habitats en régression (Rasmont & Mersch, 1988 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Rasmont *et al.*, 2005a ; Goulson, 2009). La dernière espèce étudiée, *B. melanurus*, semble protégée de l'intensification agricole grâce à sa spécialisation d'habitat. En Turquie, les prairies alpines ne sont pas converties en cultures intensives (Rasmont, in prep.).

5. Conclusion

Pour la première fois, la composition des sécrétions labiales céphaliques des 4 espèces *Subterraneobombus* de la région ouest-paléarctique est fournie. En nous basant sur le concept d'espèce de Paterson, nous avons pu nous prononcer sur le statut taxonomique des 4 espèces. Pour *B. subterraneus*, nous avons analysé la variabilité infraspécifique géographique.

Sur base de la composition phéromonale, nous validons le statut taxonomique des 4 espèces étudiées.

B. subterraneus, *B. distinguendus* et *B. melanurus* sécrètent des composés terpéniques (geranylcitronnellal et geranylgeranial) comme molécules majeures, alors que *B. fragrans* sécrète des dérivés d'acide gras à 18 carbones (octadécadiénal, octadecenal et octadecenyl acetate). Des alcènes et alcanes à plus de 20 carbones se retrouvent dans les sécrétions des 4 espèces.

Au niveau infraspécifique, l'espèce *B. subterraneus* présente deux tendances : un groupe composé des sous-espèces *tectosagorum* (Pyrénées) et *liguriensis* (Alpes) et un groupe composé des sous-espèces *subterraneus* (Suède) et *latreillellus* (Turquie). Les 4 sous-espèces ne semblent pas en cours de spéciation.

Le dendrogramme obtenu sur base des compositions phéromonales des 4 espèces étudiées ne reflète pas la phylogénie établie par Hines (2008).

6. Perspectives

La génétique moléculaire et la morphométrie sont des pistes qui apporteraient des informations complémentaires sur le statut taxonomique des espèces et sous-espèces étudiées. Des tests éthologiques permettraient également de statuer sur l'attractivité des phéromones.

Une quantification des sécrétions labiales céphaliques permettraient d'établir si les phéromones du sous-genre *Subterraneobombus* sont réduites ou non.

Même si certains auteurs s'efforcent de fournir des indications utiles sur les causes et l'écologie des espèces menacées (Rasmont, 1995 ; Hughes, 1998 ; Goulson *et al.*, 2005 ; Williams *et al.*, 2007 ; Charman *et al.*, 2009 ; Howlett *et al.*, 2009), la connaissance de ces espèces est actuellement encore trop fragmentaire, ce qui gêne les mesures de conservation effectives (Goulson, 2009). Les efforts doivent continuer dans ce sens. Des études taxonomiques et écologiques d'autres espèces menacées sont requises pour la survie et le maintien de ces espèces en région ouest-paléarctique.

7. Bibliographie

- Ågren L., Cederberg B. & Svensson B.G., 1979. Changes with age in ultrastructure and pheromone content of male labial glands in some bumble bee species (Hymenoptera, Apidae). *Zoon* 7: 1-14.
- Alcock J., Barrows E.M., Gordh G., Hubbard J., Kirkendall L., Pyle D. W., Ponder T.L. & Zalom F.G., 1978. The ecology and evolution of male reproductive behavior in the bees and wasps. *Zoological Journal of the Linnean Society* 64: 293-326.
- Alford D.V., 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London. XII + 352 p.
- Anagnostopoulos I.T., 2009. New Balkan records of *Bombus subterraneus* (Linnaeus 1758) and *Bombus cryptarum* (Fabricius 1775) from Greece. *Entomologia Hellenica* 18: 56-61.
- Appelgren M., Bergström G., Svensson B.G. & Cederberg B., 1991. Marking Pheromones of *Megabombus* Bumble Bee males. *Acta Chemica Scandinavica* 45: 972-974.
- Ayasse M., Paxton R.J. & Tengö J., 2001. Mating behavior and chemical communication in the order Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* 46: 31-78.
- Ball F.J., 1914. Les bourdons de la Belgique. *Annales de la Société Entomologique de Belgique* 58: 77-108.
- Ball F.J., 1920. Notes complémentaires sur les bourdons de la Belgique. *Bulletin et Annales de la Société Entomologique de Belgique* 60: 31-43.
- Banaszak J., 1992. Strategy for conservation of wild bees in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 40: 179-192.
- Barbier Y. & Rasmont P., 2002. Carto-Fauna-Flora, logiciel de cartographie de données biogéographiques. Version 2.0. Université de Mons-Hainaut, 59 p, 1 CD-rom.
- Barbier Y., Rasmont P., Dufrene M. & Sibert J.-M., 2002. Data-Fauna-Flora. Banque de données. Version 2.0. Université de Mons, 106 p, 1 CD-rom.
- Barrows E.M., Bell W.J. & Michener C.D., 1975. Individual odor differences and their social functions in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72: 2824-2828.
- Bergman P., 1997. *Chemical communication in bumblebee premating behaviour*. Ph-D Thesis, Department of Chemical Ecology. Göteborg University, Göteborg, Sweden. 30 p + Annexes.
- Bergman P. & Bergström G., 1997. Scent marking, scent origin and species-specificity in male premating behavior of two Scandinavian bumblebees. *Journal of Chemical Ecology* 23(5): 1235-1251.
- Bergström G. & Svensson B.G., 1973. Studies on natural odoriferous compounds VIII. Characteristic

marking secretions of the forms *lapponicus* and *scandinauicus* of *Bombus lapponicus* Fabr. (Hymenoptera, Apidae). *Chem. Scr.* **4**: 231-238.

Bergström G., 1981. Chemical aspects of insect exocrine signals as a mean for systematic and phylogenetic discussions in aculeate Hymenoptera. *Ent. Scand. Suppl.* **15**: 173-184.

Bergstrom G., Svensson B.G., Appelgren M. & Groth L., 1981. Complexity of bumble bees marking pheromones : biochemical, ecological and systematical interpretations. *Systematics Association* **19**(special volume): 856-857.

Bertsch A., Schweer H., Titze A. & Tanaka H., 2005a. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *B. magnus* (Hymenoptera, Apidae). *Insect Society* **52**: 45-54.

Bertsch A., Schweer H. & Titze A., 2005b. Analysis of the Labial Gland Secretions of the Male Bumblebee *Bombus griseocollis* (Hymenoptera: Apidae). *Z. Naturforsch.* **59**: 701-707.

Brunetto P. 2007. *Chromatographie en Phase Gazeuse GC/GC-MS.* Travaux Pratiques de chimie analytique de 2ème année. Université de Fribourg, Suisse. 17 p.

Calam D.H., 1969. Species and Sex-specific Compounds from the Head of Male Bumblebees (*Bombus spp.*). *Nature* **221**: 856-857.

Cameron S.A., Hines H.M. & Williams P.H., 2007. A comprehensive phylogeny of the bumble bees (*Bombus*). *Biological Journal of the Linnean Society* **91**: 161-188.

Cederberg B., Svensson B.G., Bergström G., Appelgren M. & Groth I., 1984. Male marking Pheromones in North European Cuckoo Bumble Bees *Psithyrus* (Hymenoptera, Apidae). *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis Ser. V:C* **3**: 161-166.

Charman T.G., Sears J., Bourke A.F.G. & Green R.E., 2009. Phenology of *Bombus distinguendus* in the Outer Hebrides. *The Glasgow Naturalist* **25**: 35-42.

Colla S.R., Otterstatter M.C., Gegear R.J., Thomson J.D., 2006. Plight of the bumble bee : pathogen spillover from commercial to wild populations. *Biological Conservation* **129**: 461-467.

Coppée A., 2005. *Caractérisation des sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae) en fonction de l'âge.* Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons. 50 p.

Coppée A., Terzo M., Valterová I. & Rasmont P., 2008. Intraspecific Variation of the Cephalic Labial Gland Secretions in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Chemistry & Biodiversity* **5**: 2654-2661.

Darwin C., 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection.* London, John Murray.

- Darwin C., 1886.** Über die Wege der Hummelmännchen. *Gesammelte Schriften von Charles Darwin* (2): 84-88.
- Daugherty C.H., Cree A., Hay J.M & Thompson M.B., 1990.** Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). *Nature* **347**: 177-179.
- Dawson R.B., 2010.** *The Great Yellow Project*. Site internet du Bumblebee Conservation trust. www.bumblebeeconservation.org.uk. Accédé le 10 mai 2010.
- Delmas R., 1976.** Contribution à l'étude de la faune française des *Bombinae* (Hymenoptera, Apoidea, Bombidae). *Annales de la Société Entomologique de France* **12**(2): 247-290.
- De Meulemeester T., Boulvin M., Coppée A., Gerbaux P. & Rasmont P., in prep.** A simplified protocol for bumble bee species identification by cephalic secretion analysis.
- Edwards M., 2000.** U.K. Biodiversity Action Plan Bumblebee Working Group Report 2000. *Unpublished report for the UK BAP bumblebee working group*, Midhurst, UK.
- Edwards M. & Williams P.H., 2004.** Where are all the bumblebees gone, and could they ever return? *British Wildlife* June: 305-312.
- Farr S.C., 1889.** Introduction of the humble bee into New Zealand. *New Zealand country journal* **13**: 284-287.
- Free J. B., 1970.** *Insect pollination of crops*. New York, Academic Press. 544 p.
- Free J. B., 1987.** *Pheromones of Social Bees*. Chapman and Hall, London, Great Britain. 218 p.
- Freeman R.B., 1968.** Charles Darwin on the routes of male humble bees. *Bulletin of the British Museum* **3**: 177-189.
- Genersch E., Yue C., Fries I. & Miranda J.R., 2006.** Detection of Deformed Wing Virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology* **91**: 61-63.
- Gorez M., 2007.** *Electro-antennographie de reines vierges de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae) vaporisées par des sécrétions des glandes labiales céphaliques mâles*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons. 67 + 6 p.
- Gorodkov K.B., 1986.** Three-dimensional climatic model of potential range and some of its characteristics. *Entomological review* **65**: 1-35.
- Gosselin M., Iserbyt S. & Rasmont P., 2007.** Faunistique comparée et écologie des bourdons (Hymenoptera, Apoidea) de la vallée de Nohèdes (France, Pyrénées-Orientales). *Notes Fauniques de Gembloux* **60**: 13-23.

- Goulson D., 2003.** *Bumblebees, Their Behaviour and Ecology*. Oxford University Press, Oxford, 235 p.
- Goulson D. & Hanley M.E., 2004.** Distribution and forage use of exotic bumblebees in South Island, New Zealand. *New Zealand journal of Ecology* **28**(2): 225-232.
- Goulson D. & Darvill B., 2004.** Niche overlap and diet breadth in bumblebees. Are rare species more specialized in their choice of flowers? *Apidologie* **35**: 55-64.
- Goulson D., Hanley M.E., Darvill B., Ellis J.S., Knight M.E., 2005.** Cause of rarity in bumblebees. *Biological Conservation* **122**: 1-8.
- Goulson D., Hanley M.E., Darvill B. & Ellis J.S., 2006.** Biotope associations and the decline of bumblebees (*Bombus* spp.). *Journal of Insect Conservation* **10**: 95-103.
- Goulson D., Lye G.C. & Darvill B., 2008.** Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology* **53**: 191-208.
- Goulson D., 2009.** Conservation of bumblebees. *The Glasgow Naturalist* **25**: 31-34.
- Grinfel'd, E.K. 1978.** Steпној shmel' - *Bombus fragrans* Pallas. *Vestnik Leningradskogo Universiteta* **3**: 15-16.
- Gurr L., 1964.** The distribution of bumble bees in the South Island of New Zealand. *New Zealand journal of science* **7**(4): 625-642.
- Haas A., 1949.** Arttypische Flugbahnen von Hummelmännchen. *Zeitschrift für vergleichende Physiologie* **31**: 281-307.
- Haas A., 1976.** Paarungsverhalten und Nestbau der alpinen Hummelart *Bombus mendax* (Hymenoptera: Apidae). *Ent. Germ.* **3**: 248-259.
- Hadley N.F., Blomquist G.J. & Lanham U.N., 1981.** Cuticular hydrocarbons of four species of Colorado Hymenoptera. *Insect Biochemistry* **11**: 173-177.
- Heinrich B., 1979.** *Bumblebee Economics*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, and London, England. 249 p.
- Helderweirt A., 2010.** *Attractivité des sécrétions labiales céphaliques de Bombus terrestris terrestris (L.) en fonction de leur origine géographique*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons, Mons. 81 p.
- Hines H., 2008.** Historical Biogeography, Divergence Times, and Diversification Patterns of Bumble Bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic Biology* **57**(1): 58-75.
- Hoffer E., 1882.** *Die Hummeln Steiermarks. Lebensgeschichte und Beschreibung derselben. I. Hälfte*. Leuschner & Lubensky, Graz. 2 + 92 p, 3 pls.

- Homberg U., 2004.** Multisensory Processing in The Insect Brain. *Methods in Insect Sensory Neuroscience*: 3-25.
- Hopkins I., 1914.** History of the bumblebee in New Zealand: its introduction and results. *New Zealand Department of Agriculture, Industry and Commerce* **46**: 1-29.
- Hovorka O., Valterová I., Rasmont P. & Terzo M., 2006.** Male Cephalic Labial Gland Secretions of Two Bumblebee Species of the Subgenus *Cullumanobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus* Latreille) and Their Distribution in Central Europe. *Chemistry & Biodiversity* **3**: 1015-1022.
- Howard D.C., Watkins J.W., Clarke R.T., Barnett C.L. & Stark G.J., 2003.** Estimating the extent and change in broad habitats in Great Britain. *Journal of Environmental Management* **67**: 219-227.
- Howlett B.G., Donovan B.J., Read R. & Hale R.J., 2009.** Rearing *Bombus subterraneus* for re-introduction into Great Britain. *The Weta* **37**: 10-12.
- Hughes L., 1998.** The Great Yellow Bumblebee, *Bombus distinguendus* (Morawitz): Aspects of Habitat Use, Phenology and Conservation on the Machair of the Outer Hebrides, UK. MSc. Thesis, University of London.
- Iserbyt S., Durieux E.-A. & Rasmont P., 2008.** The remarkable diversity of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) in the Eyne Valley (France, Pyrénées-Orientales). *Annales de la Société entomologique de France* **44**: 211-241.
- Iserbyt S., 2009.** La faune des bourdons (Hymenoptera: Apidae) du Parc National des Pyrénées occidentales et des zones adjacentes. *Annales de la société entomologique de France* **45**: 1-28.
- Jackson B.D. & Morgan D., 1993.** Insect chemical communication: pheromones and exocrine glands of ants. *Chemoecology* **4**: 125-144.
- Karlson P. & Lüscher M., 1959.** "Pheromones": a new term for a class of biologically active substances. *Nature* **183**: 55-56.
- Kindl J., Hovorka O., Urbanová K. & Valterová I., 1999.** Scent marking in male premating behavior of *Bombus confusus*. *Journal of Chemical Ecology* **25**(7): 1489-1500.
- Kosior A., Celary W., Olejniczak P., Fijal J., Król W., Solarz W., Plonka P., 2007.** The decline of the bumble bees and cuckoo bees (Hymenoptera: Apidae: Bombini) of western and central Europe. *Oryx* **41**: 79-88.
- Kosior A., Celary W., Solarz W., Rasmont P., Fijal J., Król W., Witkowski Z. & Iserbyt S., 2008.** Long-term changes in the species composition and distribution of Bombini (Apidae) in Cracow since the mid 1850s. *Annales de la Société Entomologique de France* **44**(4): 393-407.
- Krüger E., 1928.** Über die Farbenvariationen der Hummelart *Bombus agrorum* Fabr. *Z. Morph. Ökol.*

Tiere 11: 361-494.

- Krüger E., 1951.** Über die Bahnflüge der Männchen der Gattungen *Bombus* und *Psithyrus* (Bombidae Hymenopt.). *Z. Tierpsychol.* **8**: 61-75.
- Kruseman G., 1958.** Notes sur les Bourdons pyrénéens du genre *Bombus* dans les collections néerlandaises. *Beaufortia* **6**: 161-170.
- Kullenberg B., Bergström G. & Ställberg-Stenhagen S., 1970.** Volatile Components of the Cephalic Marking Secretion of Male Bumble Bees. *Acta Chemica Scandinavica* **24**(4): 1481-1483.
- Kullenberg B., Bergström G., Bringer B., Carlberg B. & Cederberg B. 1973.** Observations on scent marking by *Bombus* Latr. and *Psithyrus* Lep. males (Hymenoptera: Apidae) and localization of site of production of the secretion. *Zoon Suppl.* **1**: 24-30.
- Kullenberg B. & Bergström G., 1975.** Chemical communication between living organisms. *Endeavour* **35**: 59-66.
- Lecocq T., 2009.** *Génétique et phéromones sexuelles des bourdons de la Corse*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons, Mons. 111 p.
- Løken A., 1973.** Studies on Scandinavian Bumble Bees (Hymenoptera, Apidae). *Norsk Entomologisk tidsskrift* **20**(1): 1-218.
- Maccagnani B., Velthuis H.H.W. & Duchateau M.J., 1994.** Mating behavior in *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera, Apidae). *Les Insectes Sociaux—Proc. Int. Congr. IUSSI, 12th*. Paris: Publ. Univ. Paris Nord. 460 p.
- Macfarlane R.P. & Gurr L., 1995.** Distribution of bumble bees in New Zealand. *New Zealand Entomologist* **18**: 29-36.
- Martin H.J., 1998.** *Hummel-Arten*. Site internet www.tierundnatur.de. Accédé le 20 mai 2010.
- Matty T., 2007.** *Préférence des reines vierges de Bombus terrestris (L.) (Hymenoptera, Apidae) envers les sécrétions des glandes labiales céphaliques des mâles de divers âges et sous-espèces*. Mémoire de fin d'études, Université de Mons-Hainaut, Mons. 71 p.
- Mayr E., 1942.** *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr E., 1963.** *Animal Species and Evolution*. Belknap Press of Harvard University, Cambridge & London, 797 p.
- Mayr E., 1974.** *Populations, espèces et evolution*. Paris, Hermann. 496 p.
- Michener C.D., 1979.** Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri botanical Garden* **66**: 277-347.

- Mori K., 1998.** Semiochemicals — synthesis, stereochemistry, and bioactivity. *European Journal of Organic Chemistry*: 1479-1489.
- Oelschlägel M., 2010.** *Hummelarten*. Site internet www.insektenstaaten.de. Accédé le 10 mai 2010.
- Osborne J.L., Williams I.H., Corbet S.A., 1991.** Bees, pollination and habitat change in the European community. *Bee World* **72**: 99-116.
- Osborne J.L. & Williams P.H., 1996.** Bumble bees as pollinators of crops and wild flowers. *Bumble bees for Pleasure and Profit*: 24-32. International Bee Research Association, Cardiff.
- Paterson H.E.H., 1985.** The Recognition concept of species. *Species and speciation. Transval Museum Monographs* **4**: 21-29. E. S. Vrba (Ed). Transval Museum, Pretoria.
- Paterson H.E.H., 1993.** *Evolution and the recognition concept of species*. The Johns Hopkins University Press, 234 p.
- Patiny S., Michez D. & Rasmont P. 2009.** Survey of wild bees in West-Palaeartic region. *Apidologie* **40**(special issue): 313-331.
- Pauly A. & Rasmont P., 2010.** *Les bourdons de la Belgique*. Site internet Atlas Hymenoptera. <http://www.zoologie.umh.ac.be/hymenoptera/page.asp?id=160>. Accédé le 30 mai 2010.
- Peeters T.M.J. & Reemer M., 2003.** *Bedreigde en verdwenen bijen in Nederland (Apidae s.l.)*. Basisrapport met voorstel voor de Rode Lijst. European Invertebrate Survey. Nederland, Leiden.
- Pekkarinen A., Teräs I., Viramo J. & Paatela J., 1981.** Distribution of bumblebees (Hymenoptera, Apidae: *Bombus* and *Psithyrus*) in eastern Fennoscandia. *Notulae Entomologicae* **61**: 71-89.
- Petersen W., 1903.** Entstehung der Arten durch physiologische Isolierung. *Biol. Zbl.* **23**: 468-477.
- Phelan P.L., 1997.** Genetics and phylogenetics in the evolution of sex pheromones. *Insect Pheromone Research. New Directions* (New York: Chapman & Hall): 563-579.
- Ponchau O., Iserbyt S., Verhaeghe J.-C. & Rasmont P., 2006.** Is the caste-ratio of the oligolectic bumblebee *Bombus gerstaeckeri* Morawitz (Hymenoptera: Apidae) biased to queens? *Annales de la Société Entomologique de France* **42**(2): 207-214.
- Rasmont P. 1983.** Catalogue commenté des Bourdons de la région ouest-paléarctique (Hymenoptera, Apoidea, Apidae). *Notes fauniques de Gembloux* **7**: 1-72.
- Rasmont P., 1988.** *Monographie écologique et zoogéographique des Bourdons de France et de Belgique* (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). Thèse de doctorat, Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux. 372 p.

- Rasmont P. & Mersch P., 1988.** Première estimation de la dérive faunique chez les bourdons de la Belgique (Hymenoptera : Apidae). *Annales de la Société royale zoologique de Belgique* **118**(2): 141-147.
- Rasmont P., Leclercq J., Jacob-Remacle A., Pauly A. & Gaspar C., 1993.** The faunistic drift of Apoidea in Belgium. *Bees for pollination. Commission of the European Communities* (E. Bruneau): 65-87.
- Rasmont P., 1995.** How to restore the apoid diversity in Belgium and France? Wrong and right ways, or the end of protection paradigm! *Trends of changes in fauna of wild bees in Europe*: 53-64. J.Banaszak, Bydgoszcz, 220 p.
- Rasmont P., Ebmer P.A., Banaszak J. & Van Der Zanden G., 1995.** Hymenoptera Apoidea Gallica. Liste taxonomique des abeilles de France, de Belgique, de Suisse et du Grand-Duché de Luxembourg. *Bulletin de la Société entomologique de France* **100**(hors série): 1-98.
- Rasmont P. & Flagothier D., 1996.** *Biogéographie et choix floraux des bourdons (Hymenoptera, Apidae) de la Turquie*. N.A.T.O.-O.T.A.N. TU-Pollination project, rapport préliminaire, Université de Mons-Hainaut, Adana Çukurova Universitesi, 69 + 3 p.
- Rasmont P., 1999.** Rapport préliminaire sur la faune des bourdons (Hymenoptera, Bombinae) des Pyrénées-Orientales; reserves des la Massane et du Vallon d'Eyne. *Travaux de la réserve naturelle de la Massane, Banyuls-sur-Mer* **52** : 1-17.
- Rasmont P., Pauly A., Terzo M., Patiny S., Michez D., Iserbyt S., Barbier Y. & Haubruge E., 2005a.** The survey of wild bees (Hymenoptera, Apoidea) in Belgium and France. *FAO*, Roma, 18p.
- Rasmont P., Terzo M., Aytakin M.A., Hines H., Urbanova K., Cahlikova L. & Valterova I. 2005b.** Pheromone analysis of the bumble bee subgenus *Sibiricobombus* Vogt suggests *Bombus niveatus* Kriechbaumer and *Bombus vorticosus* Gerstaecker are conspecific (Hymenoptera, Apidae, Bombus). *Apidologie* **36**: 571-584.
- Rasmont P., Coppée A., Michez D. & Demeulemeester T., 2008.** An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera : Apidae). *Annales de la Société entomologique de France* **44**(2): 243-250.
- Rasmont P., Aytakin A.M., Kaftanoglu O. & Flagothier D., 2009.** *The bumblebees of Turkey*. Site internet Atlas Hymenoptera. <http://www.zoologie.umh.ac.be/hymenoptera/page.asp?id=103>. Accédé le 30 mai 2010.
- Redpath N., Osgathorpe L.M., Park K. & Goulson D., 2010.** Crofting and bumblebee conservation: The impact of land management practices on bumblebee populations in northwest Scotland. *Biological Conservation* **143**: 492-500.
- Reinig W.F., 1960.** Können Hummeln stechen? *Kosmos* **56**: 310-313.

- Reinig W.F., 1970.** Bastardierungszonen und Mischpopulationen bei Hummeln (*Bombus*) und Schmarotzerhummeln (*Psithyrus*) (Hymenopt., Apidae). *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **59**: 1-89.
- Reinig W.F., 1972.** Ökologische Studien an mittel- und südeuropäischen Hummeln (*Bombus* Latr., 1802; Hym., Apidae). *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* **60**: 1-56.
- Remy C., 2010.** Cours d'herpétologie et conservation des espèces, 2ème Master Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, Belgique.
- Richards O.W., 1968.** The subgeneric divisions of the genus *Bombus* Latreille (Hymenoptera, Apidae). *Bulletin of the British Museum* **22**: 211-276.
- Ruiz-Gonzalez M.X. & Brown M.J.F., 2006.** Honey bee and bumblebee trypanosomatids: specificity and potential for transmission. *Ecological Entomology* **31**: 616-622.
- Saitou N. & Nei M., 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4** (4): 406-425.
- Schneider D., 1963.** Electrophysiological investigation of insect olfaction. *Olfaction and Taste*, ed. I Zottermann. Oxford, UK.
- Schremmer F., 1972.** Beobachtungen zum Paarungsverhalten der Männchen von *Bombus confusus* Schenk. *Z Tierpsychol.* **31**: 571-584.
- Sheppard D. & Edwards M., 1999.** *Action Plan for Bombus subterraneus*. UK Biodiversity Action Plan, Joint Nature Conservation Committee, UK.
- Sheppard D., 2009.** Bumblebees to New Zealand. *Natural England Invertebrate Ecologist*.
- Shorey H.H., 1973.** Behavioral responses to insect pheromones. *Annual Review of Entomology* **18**: 349-380.
- Sladen F.W.L., 1912.** *The humble-bee, its life history and how to domesticate it, with descriptions of all the British species of Bombus and Psithyrus*. MacMillan, London, XIII + 283 p., 6 pls.
- Šobotník J., Kalinová B., Cahlíková L., Weyda F., Ptáček V. & Valterová I., 2008.** Age-dependent changes in structure and function of the male labial gland in *Bombus terrestris*. *Journal of Insect Physiology* **54**: 204-214.
- Söderman G., 1999.** *Diversity of pollinator communities in Eastern Fennoscandia and Eastern Baltics*. Finnish Environment Institute, Helsinki, 74 p.
- Stresemann E. & Timofeeff-Ressovsky N.W., 1947.** Artentstehung in geographischen Formenkreisen: 1. Der Formenkreis *Larus argentatus-cachinnans-fuscus*. *Biologisches Zentralblatt* **66**(3): 57-76.

- Svensson B.G. & Bergström G., 1977.** Volatile marking secretions from the labial gland of North European *Pyrobombus* D. T. males (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* (Paris) **24**(2): 213-224.
- Svensson B.G., 1979.** Patrolling behaviour of bumble bee males (Hymenoptera, Apidae) in a subalpine/alpine area, Swedish Lapland. *Zoon* **7**: 67-94.
- Svensson B.G., 1980.** Species-isolating mechanisms in male bumble bees (Hymenoptera, Apidae). *Acta Universitatis Upsaliensis* **549**: 1-42.
- Svensson B., Lagerlöf J. & Svensson B.G., 2000.** Habitat preferences of nesting-seeking bumble bees (Hymenoptera : Apidae) in a agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment* **77**: 247-255.
- Terzo M., Valterova I., Urbanova K. & Rasmont P., 2003.** De la nécessité de redécrire les phéromones sexuelles des mâles de bourdons [Hymenoptera: Apidae, Bombini] publiées avant 1996 pour leur utilisation en analyse phylogénétique. *Phytoprotection* **84**:39-49.
- Terzo M., Urbanová K., Valterová I. & Rasmont P., 2005.** Intra and interspecific variability of the cephalic labial glands' secretions in male bumblebees : the case of *Bombus* (*Thoracobombus*) *ruderarius* and *B.* (*Thoracobombus*) *sylovarum* [Hymenoptera, Apidae]. *Apidologie* **36**: 85-96.
- Terzo M. & Sinkevich V.N., 2005.** Development of an experimental protocol of the attractivity of the male sexual pheromons of the *Bombus terrestris*. *Proceedings of the 3rd European Congress on Social Insects* (St. Petersburg, Russia): 172-173.
- Terzo M., Coppens P., Valterová I., Toubeau G. & Rasmont P., 2007a.** Reduced cephalic labial glands in the male bumblebees of the subgenus *Rhodobombus* Dalla Torre (Hymenoptera : Apidae : *Bombus* Latreille). *Annales de la société entomologique de France* **43**(4): 497-503.
- Terzo M., Valterová I. & Rasmont P., 2007b.** Atypical Secretions of the Male Cephalic Labial Glands in Bumblebees : The Case of *Bombus* (*Rhodobombus*) *mesomelas* Gerstaecker (Hymenoptera, Apidae). *Chemistry & biodiversity* **4**: 1466-1471.
- Thompson H.M., 2001.** Assessing the exposure and toxicity of pesticides to bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* **32**: 305-321.
- Thornhill R. & Alcock J., 1983.** *The Evolution of Insect Mating Systems*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press. 576 p.
- Thorp R.W. & Shepherd M.D., 2005.** Profile : Subgenus *Bombus*. *Red List of Pollinator Insects of North America*. The Xerces Society for Invertebrate Conservation. Shepherd, M. D., D. M. Vaughan, and S. H. Black (Ed).
- Tkalců B., 1974a.** Eine Hummel-Ausbeute aus dem Nepal-Himalaya (Insecta, Hymenoptera, Apoidea,

- Bombinae). *Senckenbergiana biologica* **55**: 311-349.
- Tkalců B., 1974b.** Ergebnisse der 1. und 2. mongolisch-tschechoslowakischen entomologisch-botanischen Expedition in der Mongolei. *Acta Faunistica Entomologica Musei Nationalis Pragae* **15**: 25-57.
- Valterová I., Urbanová K., Hovorka O. & Kindl J., 2001.** Composition of the Labial Gland Secretion of the Bumblebee Males *Bombus pomorum*. *Zeitschrift für Naturforschung (Tübingen)* **56**: 430-436.
- Valterová I., Kunze J., Gumbert A., Luxová A., Iliblikas I., Kalinová B. & Borg-Karlsen A.-K., 2007.** Male bumble bee pheromonal components in the scent of deceit pollinated orchids; unrecognized pollinator cues? *Arthropod-Plant Interactions* **1**: 137-145.
- Vetter H. & Van Pijl P.P., 2006.** *Turtles of the World Vol. 4. East and South Asia*. Chimaira, Frankfurt a. M., 160 p.
- Williams P.H. 1986.** Environmental change and the distribution of British bumble bees (*Bombus* Latr.). *Bee World* **67**: 50-61.
- Williams P.H., 1988.** Habitat use by bumble bees (*Bombus* spp.). *Ecological Entomology* **13**: 223-237.
- Williams P.H., 1991.** The bumble bees of the Kashmir Himalaya (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of The British Museum of Natural History (Entomology)* **60**: 1-204.
- Williams P.H., 1998.** An annotated checklist of bumble bees with an analysis of patterns of description (Hymenoptera: Apidae, Bombini). *Bulletin of the National History Museum of London* **67**: 79-152.
- Williams P.H. & Thomas J.C., 2005.** A bumblebee new to the New World: *Bombus distinguendus* (Hymenoptera: Apidae). *Entomological Society of Canada* **137**: 58-62.
- Williams P.H., 2005.** Does specialization explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al.. *Biological Conservation* **122**: 33-43.
- Williams P.H., Araújo M.B., Rasmont P., 2007.** Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth? *Biological Conservation* **138**: 493-505.
- Williams P.H., Cameron S.A., Hines H.M., Cederberg B. & Rasmont P., 2008.** A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie* **39**: 46-74.
- Williams P.H. & Osborne J., 2009.** Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie* **40**: 367-387.
- Winfree R., 2008.** Pollinator-Dependent Crops : An Increasingly Risky Business. *Current Biology* **18**(20): 968-969.

Žáček P., Kalinová B., Šobotník J., Hovorka O., Ptáček V., Coppée A., Verheggen F. & Valterová I., 2009. Comparison of Age-dependent Quantitative Changes in the Male Labial Gland Secretion of *Bombus Terrestris* and *Bombus Lucorum*. *Journal of Chemical Ecology* **35**: 698-705.