

**Université de Mons-Hainaut**  
Faculté des Sciences

Laboratoire de Zoologie

**Contribution à l'étude des besoins alimentaires en  
stéroïdes  
de *Bombus terrestris* (L.)**

Promoteur de thèse:  
Prof. **P. Rasmont**  
  
Sciences

Thèse présentée en vue  
de l'obtention du grade  
de Docteur en

(groupe des Sciences  
Zoologiques)

**Ariane Regali**

Décembre 1996

## Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Zoologie de la Faculté des Sciences, sous la direction de Monsieur le Professeur Pierre Rasmont. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

Je remercie Messieurs les Professeurs Séverin (Gembloux) et Marlier (Gembloux) pour leur aide et pour m'avoir permis de poursuivre mes recherches au sein de l'U.E.R. de Chimie Générale et Organique de la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

J'exprime toute ma reconnaissance envers Monsieur le Professeur R. Lafont (Paris) pour sa collaboration active ainsi que pour m'avoir accueillie dans le Laboratoire de Biochimie de l'Ecole Normale Supérieure de Paris.

J'ai bénéficié de la participation de Messieurs les Professeurs J.-C. Verhaeghe (Mons.) et B. Harmegnies (Mons) qu'ils en soient grandement remerciés. Ainsi que Messieurs les Professeurs A. Svoboda (Beltsville), F.J. Jacobs (Gent), P.-F. Röseler (Würzburg), J. Lambinon (Liège), H.H.W. Velthuis (Utrecht) et P. Falmagne (Mons) pour leurs conseils.

Que Monsieur le Dr. Ir. G. Lognay (Gembloux) reçoive ici toute ma gratitude pour sa collaboration intensive au présent travail et les nombreux conseils prodigués. Mes remerciements vont aussi à Madame le Dr. Ir. E. Baudart (Gembloux) pour ses nombreuses participations.

Je remercie Mesdames les Drs. M. Garcia (Paris) et F. Rozenfeld (Bruxelles) pour toute l'attention apportée à mon travail de recherche et à la thèse annexe. Ainsi que

Messieurs les Docteurs M.F. Feldlaufer (Beltsville) et E.H. Erickson (Beltsville) pour leur conseils.

Je remercie Mr. l'Ir. E. Bruneau (Louvain-la-Neuve) pour sa participation.) pour leurs nombreux conseils, leur aide et leur disponibilité.

Au cours de ces cinq années de recherches dans le laboratoire de Zoologie, j'ai eu l'occasion de rencontrer de nombreux chercheurs. Certains n'ont fait que passer les autres sont toujours là! Notre goût commun de la biologie qui nous a réuni, nous a donné l'occasion, tout au long de nos longues discussions de nous ouvrir à d'autres opinions voir même à d'autres cultures. Que Messieurs l'Ir. Y. Barbier (Mons), F. Debaille (Mons), E. Druart (Mons), D. Flagotier (Mons), S. Rousseau, X. Simon (Mons ), M. Terzo (Mons) et P. Viville (Mons), Mesdemoiselles P. Demol et Y. Djegham (Mons), Mesdames C. Hayez et C. Marot soient ici remerciés pour tout ça mais encore pour leur collaboration active au présent travail, leur humour et leur disponibilité.

Je remercie également Monsieur F. Delmarquette (Mons) dont l'art de la récupération et l'aide technique m'ont souvent été très utiles; ainsi que Madame M. Hardenne (Gembloux) et Monsieur D. Trisman (Gembloux) pour leur aide technique.

J'ai reçu du matériel expérimental de l'ancienne firme Duclos (Marseille) et de la firme Caldic Belgium (Hemiksem), qu'ils en soient remerciés.

J'exprime également ma reconnaissance au Fonds de la Recherche Industrielle et Agronomique (F.R.I.A.) pour les bourses de spécialisation qui m'ont été attribuées.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, sans laquelle rien de tout ceci ne serait jamais arrivé, et mon époux, pour leur patience, leurs encouragements et leurs nombreux conseils avisés.

## Résumé

*Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae) est un insecte phytophage. Il se nourrit exclusivement de pollen et de nectar. Le nectar est composé en majeure partie de sucre et d'eau. La composition chimique du pollen est plus complexe, hydrates de carbone, eau, minéraux, protéines et lipides y forment un mélange variable suivant la plante.

Dans la région méditerranéenne *Bombus terrestris* se nourrit une grande partie de l'année sur les seules fleurs de l'arbousier (*Arbutus unedo* L.). Le pollen d'arbousier présente des particularités chimiques remarquables. Le 24-méthylènecholestérol, phytostérol habituellement très abondant dans les pollens, y représente moins de 3 % des stérols totaux alors que le  $\beta$ -sitostérol avoisine les 40 %. Cette composition stérolique inhabituelle est à mettre en parallèle avec une autre constatation. Délaissé par *Apis mellifera* le pollen de l'arbousier est abondamment récolté par *Bombus terrestris* dont il constitue la principale source de nourriture en hiver dans le Massif des Maures. Ces deux Apoïdes, très proches d'un point de vue taxonomique et ayant les mêmes habitudes alimentaires, adoptent un comportement alimentaire différent vis-à-vis du pollen d'*Arbutus unedo*.

L'abeille domestique est capable d'utiliser le 24-méthylènecholestérol en grande quantité, une hypothèse serait que ses besoins essentiels en stérols diffèrent significativement de *Bombus terrestris*.

L'ajout de 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol ou de cholestérol à l'alimentation de colonies de *Bombus terrestris* provoque une diminution de l'effectif. Pourtant, ces stérols n'ont aucun effet anti-appétent, au contraire. A l'opposé, le stigmastérol est le seul stérol à augmenter les performances zootechniques des colonies en diminuant significativement la durée de la

période précédant l'émergence de la progéniture lorsqu'il est ajouté à l'alimentation. Il n'en augmente néanmoins pas l'appétence.

L'analyse stérolique des prépuces élevées dans les colonies nourries de pollen supplémenté en  $\beta$ -sitostérol, cholestérol ou stigmastérol met en évidence une augmentation significative du taux du stérol étudié dans le corps des prépuces nourries du pollen enrichi. Quant aux adultes, mâles et femelles de *Bombus terrestris* ils présentent des profils en stérols comparables à ceux d'*Apis mellifera* (L.) (Hymenoptera: Apidae) et *Megachile rotundata* (Hymenoptera: Megachilidae); c'est à dire, une forte proportion de 24-méthylènecholestérol suivie du  $\beta$ -sitostérol et du  $\Delta^5$ -avénastérol (isofucostérol). Nourries de pollen supplémenté en cholestérol les prépuces synthétisent préférentiellement des ecdystéroïdes à 27 carbones (20-hydroxyecdysone, ecdysone). Contre des hormones de mue à 28 carbones (20-désoxymakistéron A, makistéron A) chez les individus élevés avec le pollen supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol. Ces quatre ecdystéroïdes sont synthétisés à égale importance par les prépuces élevées avec le pollen enrichi en stigmastérol. Il semble donc bien que *Bombus terrestris* soit capable de moduler la synthèse de ses hormones de mue en fonction des stérols présents dans son alimentation. Par contre, l'abeille domestique ne synthétise que la makistéron A (C28) dont le stérol précurseur est le campestérol (C28) (Feldlaufer & al., 1985; 1986a). Le 20-hydroxyecdysone est absent ou synthétisé en très faibles quantités à condition d'injecter du cholestérol dans les pupes d'abeilles (Feldlaufer & al., 1986a). On comprend mieux dès lors l'attitude de ces deux insectes vis-à-vis du pollen d'*Arbutus unedo* plus apte à rencontrer les besoins physiologiques de *Bombus terrestris* que d'*Apis mellifera*.

# TABLE DES MATIERES

<b>I. INTRODUCTION</b>	1
1. Eco-éthologie de <i>Bombus terrestris</i> (L.)	3
2. Eléments de physiologie des insectes et de digestion des aliments	8
3. Alimentation naturelle de <i>Bombus terrestris</i> : le nectar et le pollen	12
4. Besoins nutritionnels des insectes, plus particulièrement ceux d' <i>Apis mellifera</i> L. et de <i>Bombus terrestris</i> (L.)	16
5 <i>Bombus terrestris</i> (L.), <i>Apis mellifera</i> L. et l'arbousier	33
<b>II.OBJECTIF DU TRAVAIL</b>	35
<b>III. MATERIEL ET METHODES</b>	39
1. Analyses stéroliques de pollens récoltés par les bourdons, comparaison avec des pollens récoltés par les abeilles domestiques	40
2. Tests sur la qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, du cholestérol et du stigmastérol	46
3. Tests d'appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	55
4. Stérols corporels de <i>Bombus terrestris</i> (L.), comparaison avec la nature et la teneur des stérols contenus dans le corps d'abeilles domestiques ( <i>Apis mellifera</i> L.)	58
5. Composition en stérols de prépuces de <i>Bombus terrestris</i> (L.) soumises à une alimentation enrichie en $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	60
6. Nature des ecdystéroïdes (hormones de mue) mis en évidence dans les prépuces de bourdons mâles ( <i>Bombus terrestris</i> (L.))	62

<b>IV. RESULTATS</b>	67
1. Analyses stéroliques de pollens récoltés par les bourdons, comparaison avec des pollens récoltés par les abeilles domestiques	68
2. Tests sur la qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, du cholestérol et du stigmastérol	74
3. Tests sur l'appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	89
4. Stérols corporels de <i>Bombus terrestris</i> (L.), comparaison avec la nature et la teneur des stérols contenus dans le corps d'abeilles domestiques ( <i>Apis mellifera</i> L.)	95
5. Etude de la composition en stérols de prépupes de <i>Bombus terrestris</i> (L.) soumises à une alimentation enrichie en $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	99
6. Analyse de la nature des ecdystéroïdes (hormones de mue) contenus dans les prépupes de <i>Bombus terrestris</i> (L.) mâles	102
<b>V. DISCUSSION</b>	105
1. Nature des stérols polliniques	106
2. Qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	109
3. Appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol	116
4. Métabolisme stéroïdien et ecdystéroïdien	119
<b>VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVE</b>	125
<b>VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	130
<b>VIII. ANNEXES</b>	144

## **I. INTRODUCTION**



Les bourdons sont des insectes holométaboles (Hyménoptères Apocrites) appartenant à la super-famille des Apoidea, à la famille des Apidae et à la sous-famille des Bombinae.

Selon l'estimation, probablement sous-évaluée, de Skorikov (1922), il existerait 307 espèces de bourdons. La plupart se répartissent dans les régions tempérées avec quelques exceptions dans les zones équatoriales d'Asie du Sud-Est et d'Amérique du Sud (Skorikov, 1922). Grâce à leurs poils protecteurs et à leur système de thermorégulation particulier, les bourdons sont capables de survivre dans des conditions météorologiques difficiles (Heinrich, 1979). Ainsi, on en trouve aussi dans les régions situées très au nord (Groenland, Spitzberg, île d'Ellesmere) où ils sont les principaux pollinisateurs (Richards, 1973).

Ils vivent en sociétés uni-familiales divisées en castes. Le cycle de la colonie est adapté aux différents climats. Annuel dans les régions tempérées, il peut être permanent sous les tropiques (Sakagami & al., 1967; Rasmont, 1988).

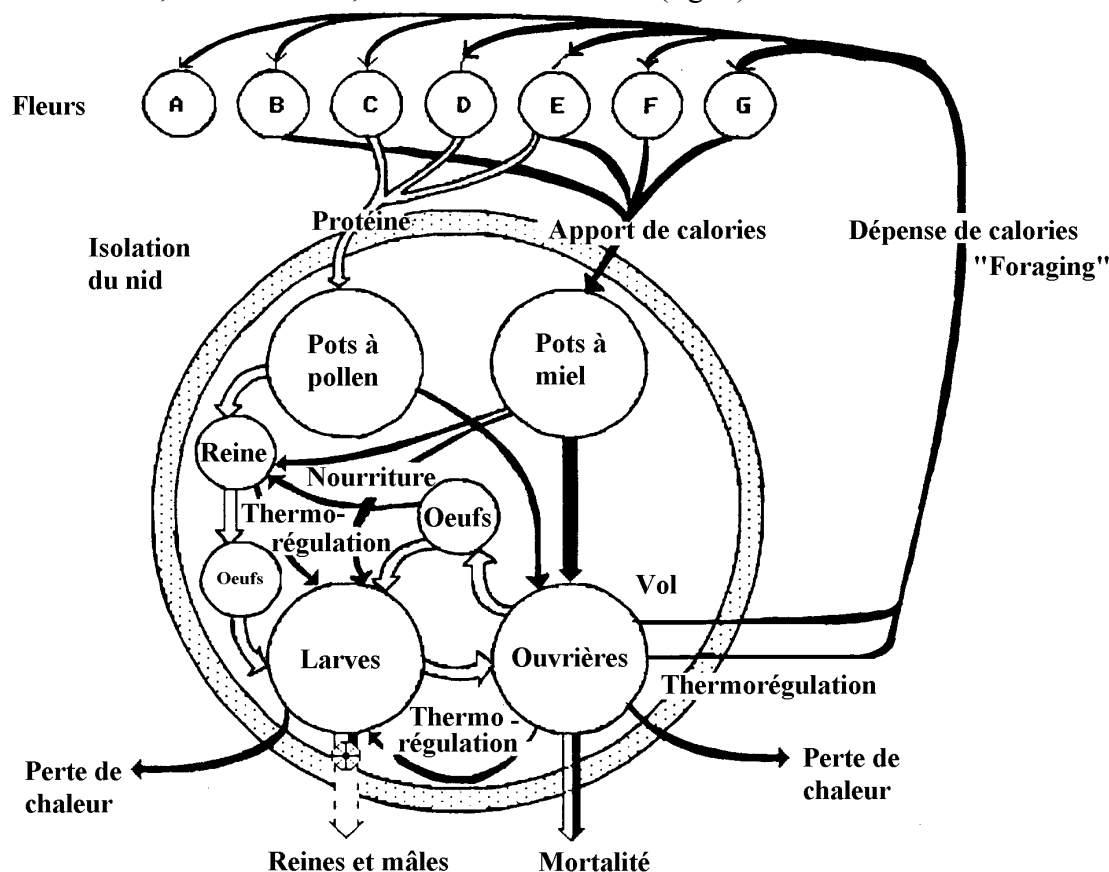
## 1. Eco-éthologie de *Bombus terrestris* (L.)

### 1.1. Double rôle de la pollinisation par *Bombus terrestris*

Les fleurs sont l'organe sexuel de la plante et la pollinisation est à la fleur l'équivalent d'une copulation. C'est le processus par lequel le grain de pollen est transporté de la fleur d'une plante à une autre. Certaines fleurs sont adaptées à la pollinisation par le vent (pollinisation anémogame) et par les oiseaux. Toutefois, la majorité des plantes sont pollinisées par les insectes qui en dépendent entièrement pour leur alimentation (Proctor & Yeo, 1973; O'Toole & Raw, 1991).

Les bourdons sont particulièrement efficaces comme pollinisateurs. Ils jouent un rôle primordial dans la pollinisation de cultures fruitières telles que myrtilles, groseilles, framboises, kiwi, cassis, aubergines, courgettes, melons et tomates (Heinrich, 1979, Macfarlane & Ferguson, 1983) et sont d'une importance inestimable pour la pollinisation de la luzerne, du trèfle violet, du colza (Delbrassinne & Rasmont, 1988). La morphologie, la couleur et l'odeur des fleurs jouent un rôle important dans leur choix floral (Macior, 1971; Velthuis, 1992). En effet, ils visitent préférentiellement les fleurs à couleurs contrastées, qui réfléchissent les ultra-violets, les fleurs à corolle aux stries rayonnantes, aux contours irréguliers et découpés. Ils se portent plus souvent sur des fleurs dont les pétales sont réunis en une corolle tubulaire en forme d'entonnoir (Proctor & Yeo, 1973; Pesson & Louveaux, 1984; O'Toole & Raw, 1991; Dafni, 1992). On observe également une co-adaptation entre la profondeur des corolles et la longueur de langue des différentes espèces de bourdons (Inouye, 1977a, 1977b, 1978, 1980; Pekkarinen, 1979). Aux hautes latitudes, les bourdons sont les principaux pollinisateurs. En cela ils constituent un maillon clef, un goulot fonctionnel des écosystèmes nordiques. Parmi les pollinisateurs de nos régions, *Bombus terrestris* (L.) pollinise des centaines d'espèces de plantes différentes (Rasmont, 1988).

La pollinisation permet d'apporter à la colonie l'énergie nécessaire à son fonctionnement. Les bourdons butinent du lever au coucher du soleil et peuvent rapporter à la colonie plus de la moitié de leur poids en pollen en un seul trajet (Alford, 1975; Heinrich, 1979; Pesson & Louveaux, 1984). Protéines, lipides, vitamines et minéraux nécessaires à la croissance de la larve sont issus essentiellement du pollen. Après leur émergence, les ouvrières s'en nourrissent encore quelques jours. Ensuite, elles peuvent s'alimenter exclusivement de nectar pendant le reste de leur vie. Les sucres qu'il contient constituent la provision d'énergie dont elles ont besoin pour travailler (Heinrich, 1979). Elles consomment ainsi une grande quantité d'énergie. Le bilan énergétique final reste cependant positif car elles rapportent plus de calories qu'elles n'en consomment (fig. 1). Le sucre des pots à miel est réparti entre la reine et les ouvrières, qui le distribuent aux larves, directement, sous forme de nourriture et, indirectement, sous forme de chaleur (fig. 1).



**Figure 1.** Représentation schématique du flux de matière et d'énergie au sein de la colonie de bourdons. Dessin original d'après Heinrich (1979), modifié en fonction des découvertes de Velthuis (1992). Les flèches noires représentent le flux de calories et les flèches blanches le flux de protéines.

## 1.2. Cycle de vie d'une colonie de bourdons (*Bombus terrestris* (L.)), rôle de l'alimentation

Sous nos latitudes, le cycle de vie d'une colonie de *Bombus terrestris* est d'un an. Au printemps, la jeune reine fécondée avant l'hiver, sort d'hibernation. Après avoir trouvé un abri pour fonder une colonie, souvent un terrier de rongeur (Djegham & al., 1994), elle fait des réserves de nourriture sous forme de nectar et de pollen. Le pollen est compacté en un amas, appelé pain, dans lequel la reine pond sa première série d'oeufs. Ceux-ci se transforment en larves d'ouvrières nourries de pollen et de nectar par la reine. Alors que les premières ouvrières n'ont pas encore émergé de leurs cocons, la reine pond sur ceux-ci une deuxième série d'oeufs dont s'occuperont les ouvrières émergées du premier pain. La reine pond ainsi plusieurs séries d'oeufs. Les ouvrières pondent aussi mais, les individus de la colonie sont en majorité issus de la production royale car la reine mange la plupart des oeufs des ouvrières (fig.1) (Velthuis, 1992).

L'oeuf diploïde est bipotentiel: la larve peut se développer en reine ou en ouvrière. La larve de reine est alimentée à intervalles fréquents et n'a pas dès lors la possibilité de fabriquer prématurément son cocon. Elle reçoit, ainsi, plus d'aliments que les futures ouvrières (Heinrich, 1979). Chez *Bombus terrestris*, la caste n'est pas seulement déterminée par la quantité de nourriture ingérée par la larve. Selon Röseler (1991), le contrôle hormonal de la reine joue également un rôle essentiel. La taille des bourdons est déterminée dans les stades larvaires par la nutrition et l'emplacement des larves dans le couvain. Les individus de la périphérie reçoivent moins de nourriture et deviennent de petites ouvrières qui butineront rarement mais seront plutôt des nourrices. Les colonies de bourdons destinées à l'industrie maraîchère ont intérêt à être nourries *ad libitum* afin d'obtenir des pollinisateurs plus grands et donc plus performants. De plus, la teneur nutritive du pollen et notamment sa concentration

en protéines joue un rôle considérable dans le rendement des colonies de bourdons (Regali & Rasmont, 1995).

Les butineuses se chargent de la récolte du pollen et du nectar; les autres individus restent dans la colonie pour s'occuper de la progéniture royale (nourricières) (fig. 1). Un nid peut ainsi compter jusqu'à 1570 cocons d'ouvrières, de mâles et de reines (Donovan & Wier, 1978). En début de cycle, la reine pond les oeufs destinés à devenir des ouvrières et en fin de cycle (été), apparaissent les mâles et les jeunes reines (fig. 1) (Plowright & Plowright, 1990). En fin d'été, les mâles et les jeunes reines quittent les colonies et s'accouplent. Les premiers meurent et les jeunes reines fécondées s'abritent et hivernent. La colonie d'origine avec les ouvrières et la vieille reine s'éteint avant l'hiver (Alford, 1975; Heinrich, 1979).

### **1.3. *Bombus terrestris*, importance dans l'industrie maraîchère**

Les abeilles mellifères sont connues et utilisées par l'homme depuis le Néolithique (Chauvin, 1968). Sans doute à cause des traditions d'apiculture, elles étaient auparavant utilisées de préférence pour la pollinisation des cultures maraîchères. Toutefois, les limitations physiologiques et éthologiques de l'abeille domestique réduisent peu à peu son emploi au profit des bourdons plus efficaces pour la pollinisation de nombreuses cultures sous serre (fraisiers, tomates, courgettes, aubergines, poivrons et melons) ou même en pleine terre (trèfle, cassis, framboise, féverolles) (Banda & Paxton, 1991; Wilmer & al., 1994). Les bourdons visitent les fleurs de façon beaucoup plus intensive et résistent mieux aux variations climatiques (température, humidité, vent) que les abeilles domestiques. Ils pollinisent toujours les plantes proches du nid et sélectionnent les fleurs les plus réceptives sur les stigmates desquelles ils déposent de plus grandes quantités de pollen (De Wael & al., 1990; Banda & Paxton, 1991; Wilmer & al., 1994).

En ce qui concerne la culture des tomates sous serre, la pollinisation est parfois assurée par des vibreurs mécaniques. Toutefois, cette technique donne de moins bons

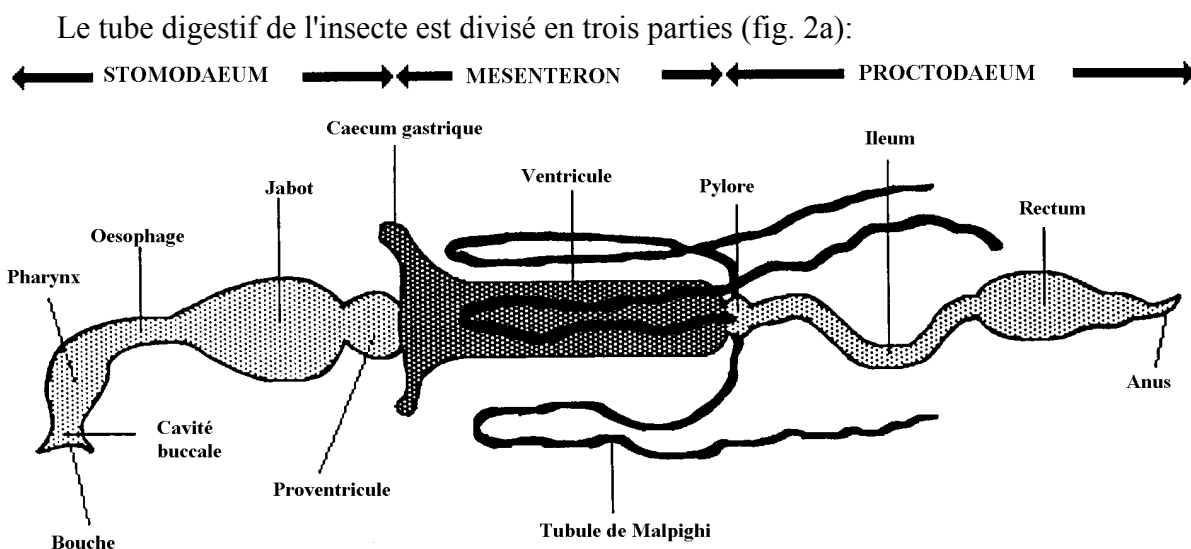
résultats en qualité et en quantité. Elle est aussi chère en main-d'oeuvre (Navez & Budin, 1990; Banda & Paxton, 1991). L'utilisation des bourdons oblige aussi à se passer d'insecticides ce qui encourage la lutte biologique et permet une diminution des résidus toxiques sur les fruits vendus. Les bourdons profitent donc à tous, producteurs et consommateurs.

Il existe depuis près de dix ans une véritable "industrie" de l'élevage du bourdon dans le monde. De nombreuses sociétés sont apparues au Pays-Bas, en Belgique, en Espagne, au Canada et en Nouvelle-Zélande qui représentent des centaines d'emplois et un chiffre d'affaires largement supérieur au milliard de FB.

Une des principales difficultés de ces pratiques d'élevage est l'alimentation. Jusqu'ici, le seul aliment protéique donnant des résultats satisfaisants est le pollen frais, collecté par l'abeille domestique et congelé. Cependant, cet aliment, au prix de revient élevé, peut être vecteur de maladies et contient souvent des résidus de pesticides. De plus, sa qualité sanitaire dépend d'une chaîne de froid toujours difficile à établir et à contrôler. Enfin, le pollen récolté par les abeilles n'apporte probablement pas tous les éléments nutritifs nécessaires aux bourdons. Il y a donc un intérêt certain à rechercher des suppléments et des substituts au pollen.

## 2. Eléments de physiologie des insectes et de digestion des aliments

### 2.1. Anatomie du tractus digestif



**Figure 2a.** Schéma représentant les principales subdivisions et appendices du tube digestif de l'insecte (Snodgrass, 1956 repris par Chapman, 1982).

#### Le stomodaeum

Il est d'origine ectodermique et compartimenté en un pharynx, un oesophage, un jabot dans lequel la nourriture est stockée et un proventricule (ou gésier) sécrétant la membrane péritrophique. Cette membrane protège les parois du tube digestif contre toute agression mécanique ou parasitaire issue du bol alimentaire. Elle est perméable aux enzymes digestives. Le proventricule agit également comme une soupape limitant le reflux de nourriture, sans pour autant empêcher la régurgitation de liquides (Chapman, 1982).

#### Le mésentéron

Il s'agit d'un tube d'origine endodermique, présentant 4, 6 ou 8 caeca à la partie antérieure et dont la lumière est tapissée par la membrane péritrophique chez de nombreux insectes (Snodgrass, 1956; Chapman, 1982).

### **Le proctodaeum**

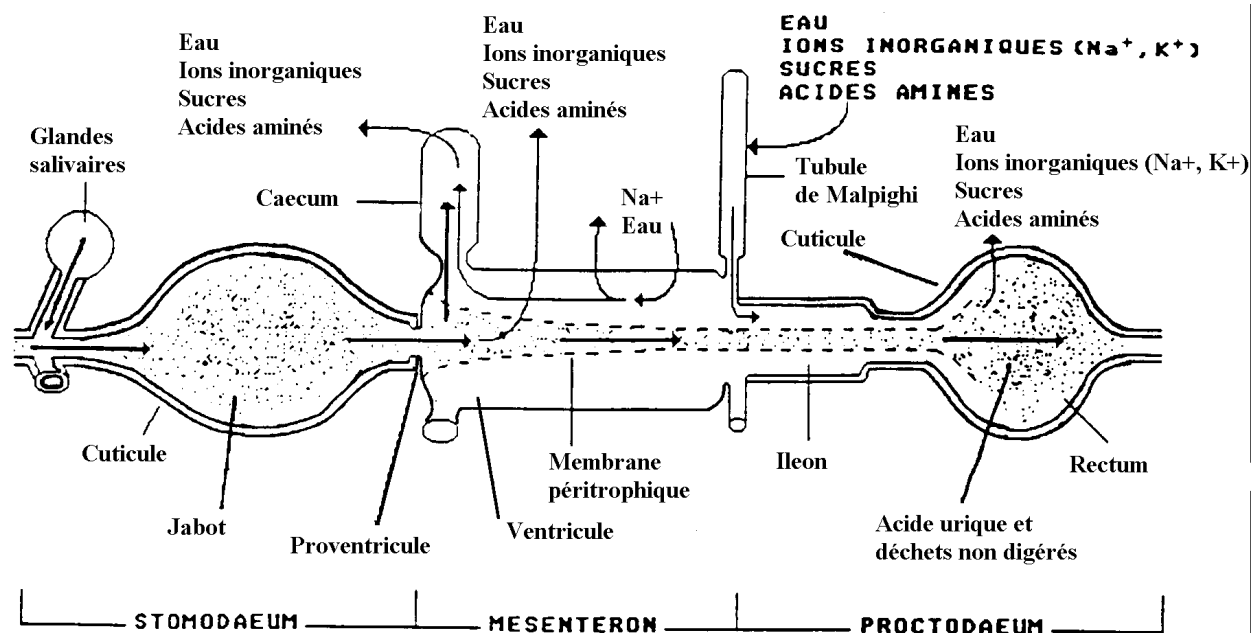
Il est subdivisé en un pylore, un ileum (intestin) et un rectum. Au pylore, aboutissent des tubes de Malpighi qui, notamment chez les bourdons, accumulent des produits d'excrétion, ensuite déchargés dans l'intestin (Alford, 1975).

Au niveau de la tête, se trouvent les glandes salivaires: glandes mandibulaires, maxillaires, pharyngiennes (glandes hypopharyngiennes) et labiales. Ces dernières secrètent des enzymes (amylases, invertases) qui initient la digestion des aliments. Chez l'abeille domestique, les glandes hypopharyngiennes des ouvrières produisent la gelée royale qui sert de nourriture aux larves et à la reine (De Groot, 1953). Chez les bourdons, par contre, les glandes hypopharyngiennes ne produisent pas de gelée mais secrètent des enzymes digestives (Alford, 1975).

### **2.2. Digestion et absorption des aliments (fig. 2b)**

En général, chez l'insecte, la digestion est interne et a lieu, principalement, au niveau du mésentéron où diverses enzymes sont secrétées.





**Figure 2b.** Schéma du tractus digestif de l'insecte montrant le passage de la nourriture dans le tube digestif (pointillés), l'absorption de nutriments dans les caeca, et la sécrétion de déchets au niveau des tubes de Malpighi. D'après Berridge, 1970 cité par Chapman, 1982.

Les enzymes digestives ont pour effet de cliver les composés macromoléculaires contenus dans la nourriture en composés plus simples qui pourront être absorbés et assimilés. Ainsi par exemple, les polysaccharides tels l'amidon et le glycogène sont-ils clivés en maltose, glucose et fructose par une amylase et les dissaccharides hydrolysés par une alpha-glycosidase, l'invertase. Les protéines sont clivées par une série de protéases en polypeptides et acides aminés; les lipides, principalement des triglycérides, sont hydrolysés en di- et monoglycérides ainsi qu'en acides gras libres (Chapman, 1982).

L'absorption a lieu dans le mésentéron principalement au niveau des caeca, ainsi que dans le proctodaeum. Chez l'insecte, les glucides sont absorbés sous forme de monosaccharides. Le processus résulte d'une diffusion passive depuis l'intestin vers l'hémolymphe.

Les protéines sont absorbées au niveau du mésentéron, après avoir été dégradées en acides aminés. Par ailleurs, les acides aminés excrétés en même temps que l'urine au niveau

des tubules malpighiens peuvent être réabsorbés dans le rectum avec de l'eau, divers ions et des sucres.

### **2.3. Le corps adipeux ("*fat body*")**

#### 2.3.1. Rôle

Le corps adipeux consiste en une masse, compacte ou diffuse, de cellules enfermées dans un fourreau membraneux et suspendu dans l'hémocoèle. Il stocke les réserves de nourriture et divers métabolites. Il est le siège de nombreux processus métaboliques englobant l'utilisation de substances absorbées par l'intestin, leur assimilation ou leur oxydation pour produire de l'énergie et parfois, le stockage d'acide urique (Snodgrass,1956; Chapman, 1982).

#### 2.3.2. Composition

### **Les trophocytes**

La majeure partie du "*fat body*" est constituée de cellules appelées trophocytes stockant des protéines et accumulant des réserves de nourriture principalement sous forme de graisses. Ces réserves qui augmentent généralement au cours de la période larvaire (surtout chez les holométaboles), servent de source d'énergie pour les longs vols et rendent l'insecte capable de survivre pendant les périodes de quiescence ou de diapause.

Les trophocytes peuvent se transformer en hémocytes, un des constituants de l'hémolymphe, et réciproquement, ce qui permet une grande mobilité des réserves (Snodgrass,1956; Chapman, 1982).

**Les cellules à urée**

Ces cellules sont dispersées parmi les trophocytes, dans le corps adipeux des blattes, des collemboles et des larves d'Hyménoptères apocrites (dont les Apoïdes). Elles accumulent l'acide urique car, chez ces insectes, les tubes de Malpighi sont absents ou peu fonctionnels (Chapman, 1982).

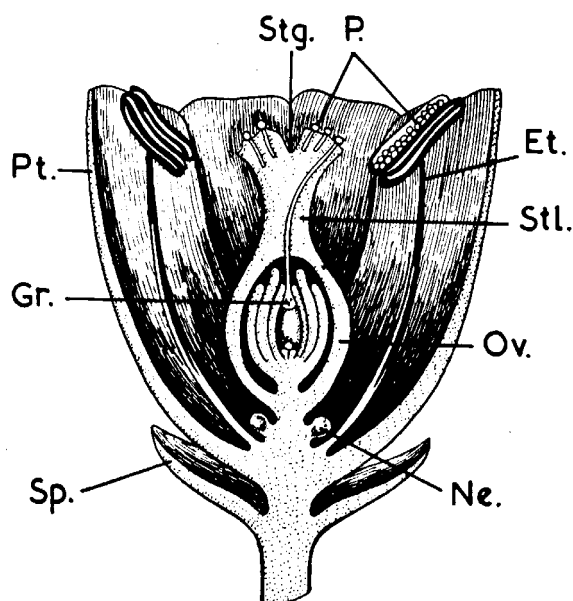
**Les mycétoctes**

Ces cellules renferment des micro-organismes symbiotiques dont le rôle est énigmatique. Ils semblent responsables de la synthèse d'éléments nutritifs comme les acides aminés essentiels, vitamines et stéroïdes très utiles lorsque la nourriture est carencée (Chapman, 1982).

### 3. Alimentation naturelle de *Bombus terrestris*: le nectar et le pollen

Le pollen et le nectar des fleurs constituent le régime unique de *Bombus terrestris*: ils apportent tous les éléments nutritifs nécessaires à sa survie, à son développement et à la perpétuation de ses colonies.

Le nectar est sécrété par les nectaires des fleurs pour attirer les insectes pollinisateurs. La position des nectaires dans la fleur est telle que les insectes sont obligés de se frotter aux étamines et aux stigmates pour y avoir accès. Ils pollinisent ainsi la plante (fig. 3). Une fois acheminé par les individus à la colonie, le nectar est transformé en miel par fermentation et ventilation.



**Figure 3.** Coupe sagittale d'une fleur (Von Frisch, 1969). Gr., graines; Ov., ovaire; Stl., Style; Stg., stigmate; P., pollen; Et., étamine; Pt., pétales; Sp., sépales; Ne., nectar.

#### 3.1. Composition chimique du nectar

Le nectar est une solution composée principalement d'hydrates de carbone (saccharose, fructose et glucose) et d'eau. C'est une alimentation énergétique (de 5 à 80 % de composés sucrés selon la plante) (O'Toole & Raw, 1991). En plus des hydrates de carbone, il contient en moyenne: 7 à 80 mg/100g d'acides aminés, des traces de protéines, des lipides et des anti-oxydants (Baker & Baker, 1975; 1979; Baker, 1977; Gilliam & al., 1980; Marot, 1992).

### **3.2. Le pollen**

#### 3.2.1. Structure

Chaque grain de pollen des plantes angiospermes (gamétophyte mâle) renferme une cellule génératrice (cellule anthéridienne) qui se divise pour former deux cellules spermatiques (matériel génétique mâle) et la cellule du tube pollinique avec son noyau végétatif. La paroi du grain de pollen est formée d'une couche externe, l'exine et d'une couche interne, l'intine. L'exine est subdivisée en sexine (externe, sculptée) et nexine (interne, non sculptée). Elle est parcourue de pores, zones de faible épaisseur, plus ou moins nombreuses selon le type de pollen (Moore & al., 1991). La paroi du grain de pollen, très résistante, protège le matériel génétique mâle au cours de son transport de l'étamine au stigmate où il sera libéré. Les pores permettent la sortie du tube pollinique renfermant les spermatozoïdes lors de la germination (Von Frisch, 1969).

La morphologie du grain de pollen varie suivant la plante dont il est issu (pores, reliefs) (fig. 4). Ces différences observables permettent une identification taxonomique détaillée.

#### 3.2.2. Composition chimique générale du pollen

La composition chimique des pollens varie suivant les plantes dont ils sont issus. De plus, selon certains auteurs, le pH et certains composants chimiques tels que stérols, acides gras, amidon et sucres peuvent subir des modifications au cours du stockage du pollen dans la colonie (Herbert & Shimanuki, 1978a; Loper & al., 1980). Le pollen est composé de protéines (7 à 40 %), lipides (1 à 20 %), minéraux (2 à 10 %), sucres et amidon (0,8 à 11 %) (Todd & Bretherick, 1942).

(1)

(2)

**Figure 4.** photos d'un grain de pollen de colza <sup>(1)</sup> et de tournesol <sup>(2)</sup> prises au microscope à balayage (Hayez, 1993).

### 3.2.3. Digestion et métabolisation du pollen. Exemple de l'abeille domestique (*Apis mellifera* L.)

Les grains de pollen sont d'abord retenus par le proventricule. Celui-ci fait saillie dans le ventricule. Il est formé de 4 lèvres, continuation des 4 plis du jabot, garnies de soies qui arrêtent la progression du pollen lors des contractions rythmiques du proventricule. Le pollen s'accumule ainsi sous forme de bol alimentaire avant d'être expulsé en masse dans le ventricule (Bailey, 1952; Chauvin, 1968; Crailsheim & Pabst, 1990). Le passage de la nourriture du jabot au ventricule dépend de la molarité de celle-ci et de son volume mais aussi de l'activité de l'abeille et de la saison (Crailsheim, 1988). Une fois dans le ventricule, le pollen y séjourne de 3 à plus de 12 heures selon la catégorie d'ouvrière (nourrice ou butineuse) avant de traverser l'iléon vers le rectum (Bailey, 1952) (fig. 2a).

Dans le proventricule de *Bombus terrestris*, en plus des soies, on trouve aussi des sortes d'écailles (Bailey, 1954 cité par Chauvin, 1968). D'après Macfarlane, ces projections semi-sphériques n'apparaissent que dans le proventricule des mâles du sous-genre *Bombus* et représentent un caractère discriminant pour celui-ci (Macfarlane, 1976).

Les points de vue sur la manière dont l'insecte digère le pollen varient d'un auteur à l'autre. Selon certains, la digestion du contenu pollinique a lieu à l'intérieur du grain de pollen perméable aux enzymes digestives (Cruz-Landim, 1985). Pour d'autres, elle s'effectue à l'extérieur de l'enveloppe cellulosique suite à une variation de la pression osmotique entre le jabot et le ventricule qui provoque une absorption d'eau puis une rupture de l'enveloppe et l'extraction des substances protoplasmiques hors de l'exine (Kroon & al, 1974, Velthuis, 1992). Tous les pollens ne sont pas digérés dans les mêmes proportions. Leur coefficient de digestibilité varie. Par exemple, le pollen de pissenlit est mal digéré par l'abeille ce qui réduit fortement sa valeur nutritionnelle (Peng & al., 1985). Hayez (1993) et Demol (1994) se sont intéressées au problème de digestibilité des acides aminés et des stérols des pollens ingérés par *Bombus terrestris*. Elles ont montré des différences notables de digestibilité des stérols

entre pollens mais ne sont pas parvenues à trancher la question de manière définitive (Hayez, 1993; Demol, 1994).

Après dégradation enzymatique du protoplasme pollinique, les produits de la digestion sont transportés de la lumière du ventricule vers l'hémolymphe (Velthuis, 1992) et les déchets de la transformation sont évacués.



#### **4. Besoins nutritionnels des insectes, plus particulièrement ceux d'*Apis mellifera* L. et de *Bombus terrestris* (L.)**

Etant donné le peu de littérature traitant des besoins alimentaires de *Bombus terrestris*, nous nous sommes souvent référée aux publications sur l'abeille domestique. En effet, *Apis mellifera* est taxonomiquement proche des bourdons et hormis les différences durant les premiers stades larvaires, on peut penser qu'ils ont, en première approximation, des besoins nutritionnels proches.

Chez les insectes, les éléments nutritifs utilisés comme source d'énergie ou comme matériaux de synthèse sont apportés par la nourriture ou métabolisés soit par l'insecte, soit probablement par des micro-organismes hôtes.

##### **4.1. Besoins nutritionnels**

Il y a un équilibre qualitatif et quantitatif à respecter dans les nutriments pour espérer une croissance normale de l'insecte. De plus, ses besoins nutritionnels se modifient au cours des différents stades de développement. Des changements de régime alimentaire peuvent conduire au polymorphisme. Par exemple, une diète qualitativement adéquate mais limitée quantitativement peut être à l'origine d'adultes de taille réduite (Chapman, 1982). Nous allons passer en revue les principaux éléments nutritifs ingérés ou synthétisés par les insectes.

#### 4.1.1. Les hydrates de carbones

Les hydrates de carbone constituent la source d'énergie de l'insecte et peuvent être transformés en graisse afin d'être stockés. Ils peuvent aussi aider à la production d'acides aminés. Ils constituent souvent une partie essentielle de l'alimentation. Ainsi, par exemple, *Schistocerca* (Orthoptère) a besoin de 20 % de sucre dans son alimentation pour lui permettre une bonne croissance. Bien que formant souvent la majeure partie de la diète, les glucides ne sont cependant pas toujours essentiels et peuvent être remplacés par des lipides ou des protéines, suivant la capacité de l'insecte à les convertir en composés intermédiaires, utilisés dans les cycles de transformation d'énergie (Chapman, 1982).

En ce qui concerne *Apis mellifera*, elle préfère les hydrates de carbone au goût doux (glucose, fructose, saccharose, maltose, tréhalose [sucre principal de l'hémolymphe], mélézitose plutôt que l'arabinose, le xylose, le rhamnose, le galactose, le mannose, le lactose, le raffinose, la dextrine, l'amidon et le mannitol) (Von Frish cité par De Groot, 1953, Barker & Lehner, 1978). Les hydrates de carbone insipides sont avalés à condition d'être mélangés à une solution de saccharose à 8% (= 0,25 M) (Vogel cité par De Groot, 1953). Elle vit 4 à 7 fois plus longtemps avec le sucrose, le fructose, le maltose, le mélézitose, le dextrose et le miel qu'avec de l'eau pure (Chauvin, 1968).

Enfin, d'après Pouvreau, lorsqu'on présente à *Bombus terrestris* des solutions sucrées simples, il choisit dans l'ordre décroissant le saccharose, le lévulose, le glucose et le maltose avec une préférence pour des concentrations de 30, 40 et 50%. Il préfère cependant les mélanges aux solutions simples. Il est à noter que la consommation augmente avec la température (Pouvreau, 1974).

#### 4.1.2. Les acides aminés

Les acides aminés sont nécessaires à la formation des enzymes et des protéines de structure. Ils constituent sous forme de protéines une part importante du régime alimentaire. Alors que 20 sont nécessaires à la synthèse des protéines, seulement 10 sont essentiels pour la majorité des insectes, dont l'abeille (tableau I). Il est à noter que des acides aminés non essentiels chez l'homme le sont chez l'abeille domestique: l'histidine et l'arginine.

**Tableau I. Besoins qualitatifs en acides aminés pour la croissance de différents organismes.** D'après De Groot, 1953. (+: acides aminés indispensables; -: acides aminés non indispensables).

Acides aminés	Vertébrés				Insectes				Protozoaires
	Homme (Albanese 1950)	Rat (Rose 1938)	Souris (Bauer-Berg 1943)	Poulet (Almqvist-Grau 1944)	Moustique (Goldberg-De Meillon 1948)	Diptère (Rudkin-Schultz 1947)	Coléoptère (Moore 1946)	Abeille domestique	Tetrahymena (Kidder-Dewey 1945)
Tryptophane	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phénylalanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Leucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Thréonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Méthionine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histidine	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Glycine	-	-	-	-	+		-	-	-
Acide glutamique	-	-	-	-	-		-	-	-
Cystéine		-	-	-	-		-	-	-
Sérine		-	-	-	-		-	-	-
Proline		-	-	-	-		-	-	-
Hydroxyproline		-	-	-	-		-	-	-
Alanine		-	-	-	-		-	-	-
Tyrosine	-	-	-	-	-		-	-	-
Acide aspartique	-	-	-	-	-		-	-	-

Chez l'abeille domestique, les besoins qualitatifs en acides aminés ont pu être déterminés en comparant l'effet de différents régimes de saccharose additionnés d'hydrolysats acides de caséine ou de mélanges d'acides aminés sur les modifications de poids et de teneur

en azote de jeunes individus (De Groot, 1953) (tableau II). Les acides aminés essentiels pour la croissance des larves sont: l'arginine, l'histidine, la lysine, le tryptophane, la phénylalanine, la méthionine, la thréonine, la leucine, l'isoleucine et la valine.

Lorsque la croissance est rapide, des acides aminés non essentiels peuvent cependant être des facteurs limitants (Swanson & Clark, cités par De Groot, 1953).

La substitution d'acides aminés essentiels par des précurseurs azotés chez la jeune abeille domestique donne des résultats variés. La carnosine est un bon substitut de l'histidine, mais la norleucine, le phénylpyruvate de sodium et l'ornithine ne peuvent pas remplacer respectivement la leucine, la phénylalanine et l'arginine. Lorsque la citrulline remplace l'arginine, la croissance est faible mais néanmoins meilleure que sans arginine car l'abeille domestique la transforme en arginine par le biais d'une réaction du cycle de Krebs. Les acides aminés non essentiels peuvent être remplacés dans une large mesure par la glycine, l'acide glutamique, l'urée, l'acétate ou le citrate d'ammonium (De Groot, 1953).

**Tableau II. Proportion minimale en acides aminés essentiels à respecter pour avoir une prise de poids optimale de la jeune abeille domestique D'après De Groot, 1953.**

Acides aminés	Niveau minimal requis par <i>Apis mellifera</i> (g/100 g de protéines)
arginine	3,0
histidine	1,5
lysine	3,0
tryptophane	1,0
phénylalanine	2,5
méthionine	1,5
thréonine	3,0
leucine	4,5
isoleucine	4,0
valine	4,0

De nombreux auteurs se sont référés à la "diète idéale" définie par De Groot, lors de leur analyse du contenu en acides aminés de pollens d'origines diverses. Ces analyses ont parfois permis de mettre en évidence des carences en acides aminés essentiels (Rayner & Langridge, 1985; Mc Caughey & al., 1980 et Gilliam & al., 1980). Ainsi, l'analyse de 31 pollens disponibles commercialement a révélé des carences systématiques en trois acides aminés essentiels: la méthionine, la valine et l'isoleucine (P. Rasmont et Pollitech S. A. grâce à un subside de l'ANVAR région bourguignonne).

Les acides aminés trouvés dans l'alimentation des animaux sont presque exclusivement de type L. On ne trouvera les acides aminés essentiels que sous cette forme à l'exception de D-histidine, D-phénylalanine et D-méthionine qui sont utilisés mais en moindre quantité que les isomères naturels. Par ailleurs, contrairement à l'homme, l'abeille domestique est incapable d'utiliser les isomères-D.

Quand à *Bombus terrestris* (L.), on sait qu'il peut extraire une partie de l'azote qui lui est nécessaire en s'alimentant sur des charognes, de l'urine humaine, des fèces d'oiseaux et de mammifères (Herrera, 1990).

Nous avons aussi démontré l'effet négatif de l'ajout à l'alimentation des bourdons de certains acides aminés. En effet, dans des colonies orphelines, une supplémentation en méthionine, valine ou isoleucine a pour effet de retarder le moment d'apparition du premier cocon, d'augmenter la durée de la période précédant l'émergence des individus, de diminuer le nombre de bourdons mâles émergés et de réduire leur durée de vie. De plus, ces trois acides aminés, n'ont aucun effet sur l'appétit des colonies (Regali & al., 1994).

#### 4.1.3. Les protéines

Maurizio (1954 cité par Lehner, 1983) montre que le développement des glandes hypopharyngiennes de l'ouvrière adulte (nourrice) d'*Apis mellifera* dépend aussi bien de la qualité que de la quantité des protéines contenues dans sa diète. Il insiste cependant sur le fait qu'une trop forte concentration de protéines pourrait avoir un effet négatif dû à l'accumulation d'éléments non digérés dans l'intestin (Maurizio, 1946, 1950, 1951 cité par De Groot, 1953).

Des essais de diète se sont basés sur la valeur nutritive de plusieurs variétés de protéines. Selon De Groot (1953), un régime formé d'hydrates de carbone et de caséine à 30°C ou à 23°C serait suffisant pour assurer à l'abeille domestique adulte un poids et une teneur en azote normaux. De plus, l'addition de lysine à une diète composée de l'hydrolysate de la protéine Zein (extraite du maïs) supplémenté par du L-tryptophane et de la cystéine, augmenterait la longévité. Il observe également une corrélation entre la présence de protéines dans le sirop et la durée de vie.

Whal (1954, 1963 cité par Herbert & al., 1977a) démontre que des colonies confinées étaient capables d'élever du couvain lorsqu'elles étaient nourries avec de la levure de bière, de la levure de *Torula*, de la farine de soja ou du lait en poudre; mais la quantité de couvain

élevée était plus petite que lorsque les colonies étaient nourries avec du pollen ou du pain d'abeille domestique.

Standifer (1973) teste d'autres substituts (à base de farine de soja, de levure de bière sèche, de lait en poudre écrémé et morceaux de viande). Il en conclut que leur valeur biologique est moindre que celle du pollen frais (Standifer & al. 1973).

La difficulté éprouvée à trouver un substitut adéquat ont amené certains chercheurs à suivre une autre voie. Ainsi Herbert & al. (1977a) ont décidé d'analyser d'abord le pain d'abeille domestique et le pollen avant d'élaborer des diètes de substitution. Ils ont ensuite nourri avec ces diètes de substitution des colonies d'abeilles domestiques récemment écloses et maintenues en cage. Le Wheast® (produit par la fermentation du petit lait de "*cottage cheese*" par *Saccharomyces fragilis*), le mélange acide lactique et Wheast®, les protéines de soja, les flocons d'avoine, le Quick Gro®, le Bee-Wheast®, le petit lait fermenté par *Saccharomyces* ou par *Lactobacillus*, la farine de graine de cotonnier, l'eau de trempage de maïs, la farine de soja et les germes de blé ont tous permis la formation de couvain. Ces différents régimes, à l'exception du Wheast®, ont été consommés en plus petite quantité que le pollen ou le pain d'abeille domestique. Le gluten de blé agit comme un attractif et le mélange de 20% de Wheast® et de 10% de gluten de blé conduit à la production d'un couvain plus abondant. Le seul substitut plus ou moins satisfaisant est le Wheast®. Hélas, celui-ci n'est plus fabriqué à l'heure actuelle.

Les abeilles domestiques nourries avec un régime constitué de saccharose et de 23% de protéines (taux de protéines correspondant à la teneur moyenne en azote [Kjeldhal] de pollens collectés dans 7 zones géographiques distinctes) provenant d'un produit mixte levure-petit lait (Wheast) ont élevé plus de couvain que celles nourries avec des régimes renfermant respectivement 30, 10, 50 et 5% de protéines. Les abeilles domestiques semblent donc avoir besoin d'une teneur optimale en protéines pour l'élevage efficace du couvain et la croissance

de la colonie. Une teneur inférieure à 23% stoppe prématurément la ponte, tandis qu'une teneur supérieure à 23% augmente la mortalité des individus (Herbert & al, 1977b).

Erickson & Herbert (1980), ont mis au point trois substituts du pollen à base de soja: le "Bland 500", le "F 200" et le "Nutrisoy T-600". A long terme, ces 3 substituts semblent moins avantageux que le pollen frais. A court terme (4 semaines), pendant la stimulation printanière, en attendant que le pollen frais devienne utilisable, le "Nutrisoy T-6" semble satisfaisant.

Ce n'est donc qu'après de nombreuses années de recherche sur *Apis mellifera*, malgré toute l'expérience due aux traditions d'apiculture et les nombreuses approches scientifiques, qu'un substitut synthétique au pollen frais récolté par les abeilles domestiques a été mis au point sans pourtant donner entière satisfaction: il n'est toujours pas possible d'élever toute une génération d'abeilles domestiques avec un substitut alimentaire. Pour les bourdons, la situation est encore plus claire: aucune recherche dans ce sens n'a encore été menée. Il n'existe donc à l'heure actuelle aucun substitut protéique pour alimenter les bourdons. Tous les essais préliminaires menés dans ce sens par le Prof. Rasmont dans le cadre de la société Pollitech S.A. se sont soldés par des échecs (Rasmont com. pers.).



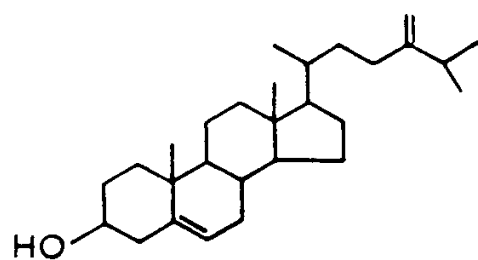
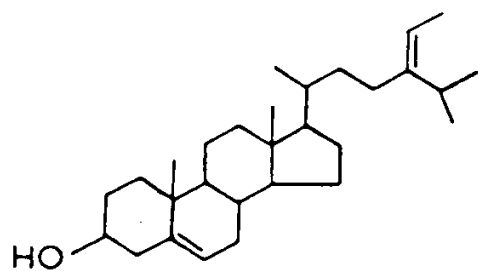
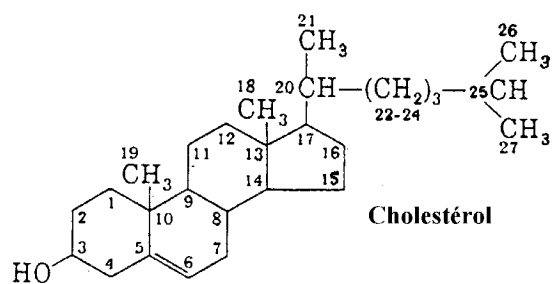
#### 4.1.4. Les lipides

Les lipides sont des molécules organiques insolubles dans l'eau. Ils ont plusieurs rôles: ils servent de composants structuraux membranaires, au transport des molécules, forment une couche de protection à la surface du corps chez beaucoup d'organismes et, comme composants de la surface cellulaire, jouent un rôle dans la reconnaissance cellulaire (Lehninger, 1981). Ils peuvent être répartis en deux groupes, les lipides complexes qui sont composés d'acides gras et sont saponifiables et les lipides simples dont font partie les stérols. Chez les insectes, les lipides semblent se répartir de manière hétérogène dans les différentes parties du corps et selon les divers stades de développement. Ainsi, chez *Apis mellifera*, les phospholipides (lipides complexes) sont concentrés dans la tête et le thorax et les acides gras dans l'abdomen (Bounias, 1983).

#### 4.1.5. Les stérols

##### 4.1.5.1. Description

Les stérols sont des stéroïdes qui contiennent un groupement hydroxyl sur le carbone 3 et une chaîne aliphatique d'au moins 8 atomes de carbone liée au carbone 17. Les stéroïdes sont des lipides simples, insaponifiables. Leur noyau est constitué de 4 cycles hydrocarbonés saturés, A, B, C et D (squelette cyclopentanophénanthrénique). Ils diffèrent entre eux par le nombre et la position des doubles liaisons, le type, la localisation et le nombre des groupes fonctionnels, dans la configuration ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) des liens entre substituants et noyau, dans la configuration ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) des cycles entre eux (fig. 5) (Roberts & Caserio, 1977; Lehninger, 1981).



**Figure 5.** Structure du cholestérol, du β-sitostérol, du 24-méthylènecholestérol et du Δ5-avénastérol. Les atomes de carbone du cholestérol sont numérotés et les cycles désignés (Roberts & al., 1977; Lehninger, 1981).

#### 4.1.5.2. Métabolisme des stérols chez les vertébrés

Chez les vertébrés, les stérols sont surtout endogènes, ils sont pour la plus grande partie synthétisés par le foie et le reste est absorbé avec la nourriture. Le cholestérol ( $C_{27}H_{45}OH$ ) est le stérol le plus abondant dans les tissus animaux (fig 5). Il est le précurseur métabolique de nombreux autres composés stéroïdes comme les acides biliaires, les hormones sexuelles mâles et femelles (androgènes, oestrogènes), la progestérone et les hormones adénocorticales.

Le cholestérol est synthétisé au départ d'acétate. Sa synthèse passe par de nombreuses réactions enzymatiques dont voici quelques étapes importantes: la conversion d'acide acétique en acide mévalonique; la conversion de ce dernier en squalène puis en lanostérol, premier stérol à être formé. Le lanostérol est alors transformé via le 7-déhydrocholestérol ou le desmostérol en cholestérol (Lehninger, 1981).

#### 4.1.5.3. Les phytostérols

Alors que le cholestérol est le principal stérol chez les vertébrés, dans le règne végétal, la majorité des stérols présente un ou deux substituants carbonés supplémentaires au niveau du carbone 24 du cholestérol. Ces stérols à 28 et 29 atomes de carbone sont appelés phytostérols. Les plus courants sont le  $\beta$ -sitostérol, le 24-méthylènecholestérol et le campestérol (Kritchevsky, 1963). L'oxydation de la chaîne latérale est apparue durant l'évolution des plantes. En effet, les plantes les plus primitives telle que les Rhodophycées ne synthétisent pas de phytostérol mais du cholestérol (Danielsson & Tchen, 1968).

Les phytostérols jouent un rôle dans la constitution et le fonctionnement des parois cellulaires et peuvent également servir de précurseurs à plusieurs phytoecdysones (Barbier, 1971). En effet, en plus des phytostérols, les plantes synthétisent des stéroïdes dont la

structure de base est identique aux hormones de mue des insectes. Du 20-hydroxyecdysone et de l'ecdysone ont été mis en évidence dans de nombreux Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes (Beck & Reese, 1975). Ces phytoecdysones, une fois ingérés par les insectes, perturbent totalement leur cycle de mue et provoquent finalement leur mort (Taiz & Zeiger, 1991). Il s'agit donc d'une adaptation co-évolutive à l'encontre des insectes phytophages. Enfin, les phytostérols peuvent être utilisés comme marqueurs taxonomiques des angiospermes (Borin & Gottlieb, 1993).

#### 4.1.5.4. Métabolisme des stérols chez les insectes phytophages

Les insectes, même les plus primitifs, à la différence des vertébrés et des plantes, sont incapables de synthétiser les stérols nécessaires à leur croissance, développement et reproduction (Clark & Bloch, 1959; Kaplanis & al., 1963). Ils doivent les puiser d'une source exogène (Clayton, 1964; Herbert & al., 1980).

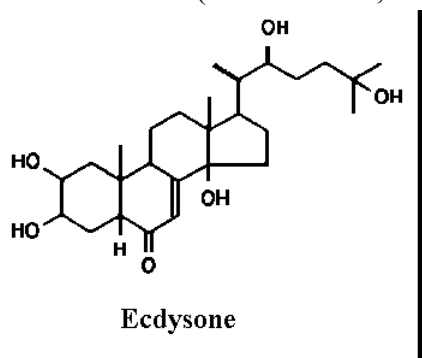
Le cholestérol est le stérol structural principal chez la plupart des insectes. C'est un composant essentiel des membranes cellulaires et des tissus nerveux (Beck & Reese, 1975). De plus, il sert de précurseur aux hormones de mue les plus communes: l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone (C27) (fig. 7) (Clayton, 1964).

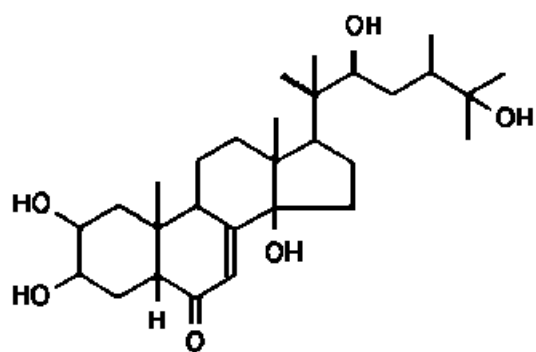
Les insectes carnassiers ou coprophages n'ont aucune difficulté à se procurer le cholestérol dont ils ont besoin. Les insectes phytophages par contre, se nourrissent de plantes ou de substances végétales qui en sont pauvres ou dépourvues. Ces insectes ont résolu ce problème par deux types d'adaptation. Certains phytophages assurent leur besoin en stérols par le biais de micro-organismes symbiotiques qu'ils renferment ou avec lesquels ils vivent en association (Clayton, 1964). La majorité des phytophages se sont adaptés d'une autre façon, ils métabolisent et convertissent les phytostérols (stigmastérol,  $\beta$ -sitostérol ou campestérol) en cholestérol (Pour rappel des voies métaboliques voir fig. 8) (Beck & Reese, 1975;

Thompson & al., 1973; Svoboda & al., 1975 cités par Herbert & al., 1980; Svoboda & al., 1980; Herbert & al., 1981). Les phytostérols sont assimilés par l'épithélium intestinal dans les cellules duquel a lieu presque toute la conversion des stérols en cholestérol. Les résidus stéroliques sont excrétés sous forme de sulfates de stérol.

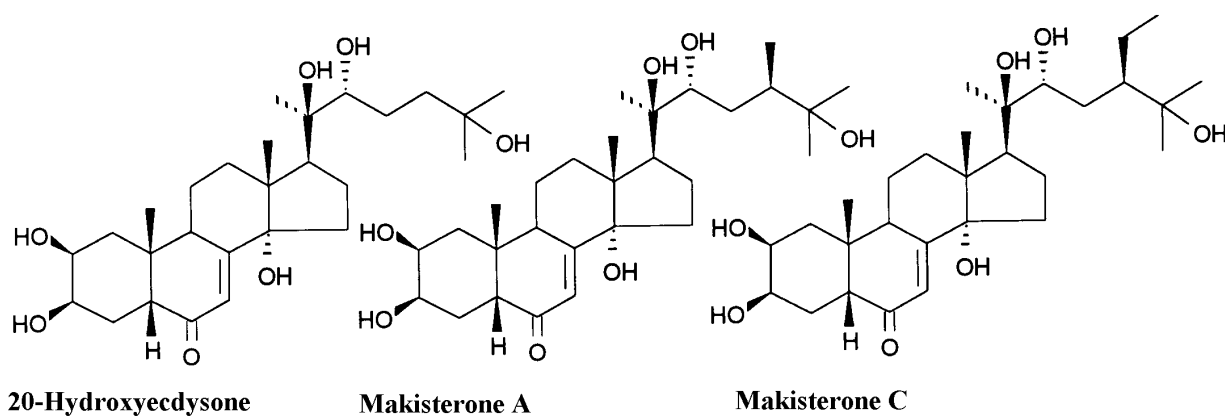
Certains insectes, comme la bruche (*Epilachna varivestis* (Mulsant), Coléoptère, Coccinellidae), la drosophile (*Drosophila melanogaster* (Herm), Diptère, Drosophilidae), certaines espèces de fourmis (*Acromyrmex octospinosus* (Reich), *Atta cephalotes isthmicola*, (Hymenoptera, Formicidae) sont incapables de convertir les phytostérols en cholestérol (Maurer & al., 1991; Ritter & al., 1982 cité par Ba & al., 1995; Svoboda & al., 1974; 1980; 1981; 1983; 1986b; 1989). Par ailleurs, chez *Apis mellifera*, le rôle du cholestérol est controversé. Contrairement aux résultats d'Allais, ceux de Svoboda montrent que les abeilles domestiques sont incapables de transformer les phytostérols à 28 et 29 carbones en cholestérol (Allais & al., 1971; Svoboda & al., 1980).

L'abeille domestique est capable de transférer de façon sélective à son couvain des quantités importantes de 24-méthylènecholestérol (Svoboda & al., 1980; Svoboda & al. 1991). De plus celui-ci semble jouer un rôle physiologique essentiel puisqu'il permet à l'abeille d'élever un plus grand nombre de couvains et de vivre plus longtemps qu'avec d'autres stérols (Herbert & al., 1980).

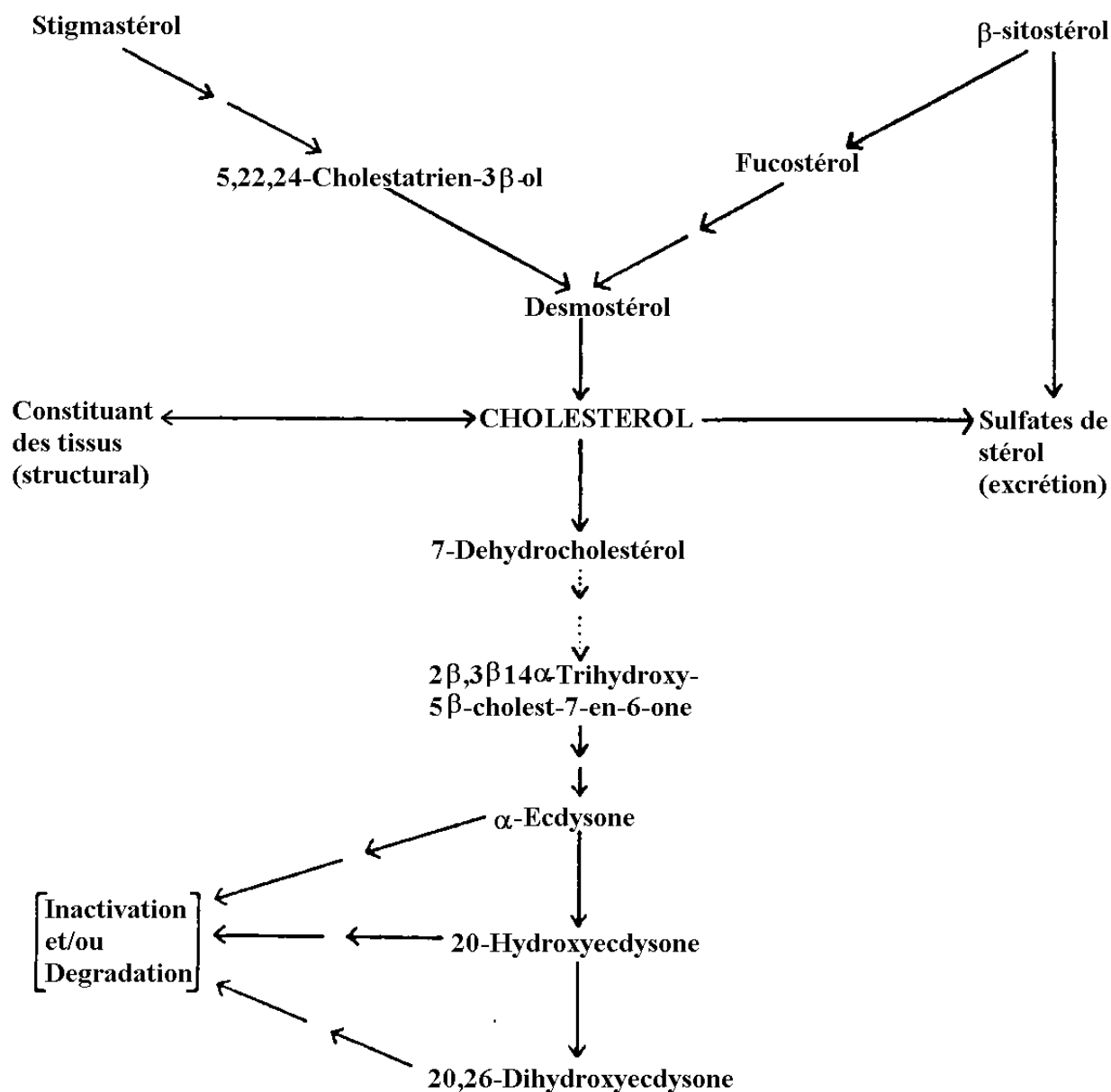




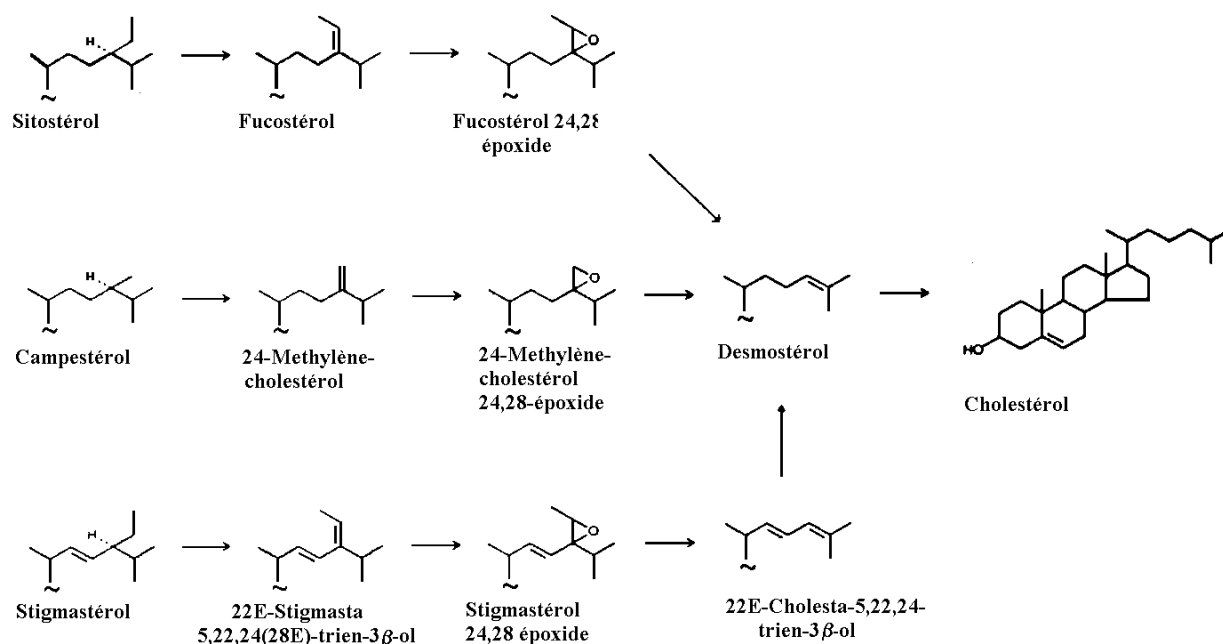
**20-Déoxymakistéron A**



**Figure 6.** Structure de l'ecdysone, de la 20-hydroxyecdysone, de la makistéron A, de la makistéron C et de la 20-déoxymakistéron A.



**Figure 7.** Schéma résumé du métabolisme des stérols chez les insectes phytophages (Robbins & al., 1971 repris dans Beck & Reese, 1975).



**Figure 8.** Schéma général de la désalkylation et de la conversion du sitostérol, campestérol et stigmastérol en cholestérol chez les insectes phytophages (Svoboda & al., 1991). Il existe plusieurs voies possibles de métabolisation des phytostérols en cholestérol suivant les insectes. Elles sont le siège de différentes réactions chimiques visant toutes à la formation du précurseur des hormones de mues, le cholestérol. Ainsi, les stérols sont tour à tour oxydés (sitostérol-fucostérol), réduits (desmostérol-cholestérol), hydroxylés (cholestérol-ecdysone) et désalkylés (Campestérol(C28)- -cholestérol(C27)).



#### 4.1.6. Les ecdystéroïdes

L'ecdysone, hormone de mue la plus commune chez les insectes avec la 20-hydroxyecdysone, est produite par les glandes prothoraciques stimulées par l'hormone d'activation qui est synthétisée par les cellules neurosecrétrices du cerveau et secrétée par les *corpora cardiaca* (Ebling & Hignam, 1969; Hartfelder, 1993). L'ecdysone conditionne le processus de mue mais aussi la croissance et la morphogenèse notamment en stimulant la synthèse d'ARN et de protéines et en stoppant la diapause larvaire et pupale (Novak, 1975). En plus de leur rôle pendant le processus de mue, les ecdystéroïdes ont bon nombre d'autres activités biologiques chez les insectes adultes comme par exemple dans la reproduction et l'embryogenèse (De Loof & al., 1984; Feldlaufer & al., 1986b; Robinson & al., 1991).

L'ecdysone est synthétisée à partir du cholestérol et peut ensuite être métabolisée en 20-hydroxyecdysone ou en 26-hydroxy et 20, 26-dihydroxy analogues (fig. 6; fig. 7) (Siddall, 1970; Beck & Reese, 1975).

Le métabolisme ecdystéroïdien varie d'une espèce d'insecte à l'autre. Chez l'abeille domestique, l'hormone de mue endogène principale des prépupes est la makistéron A une hormone à 28 carbones (fig. 6) dont le stérol précurseur semble être le campestérol, un stérol à 28 carbones aussi (Feldlaufer & al., 1985; 1986a). La 20-hydroxyecdysone est absente ou synthétisée en très faible quantité lorsqu'on injecte du cholestérol dans les pupes (Feldlaufer & al., 1986a). Chez *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae) le 24-épi-makistéron A est l'hormone de mue principale. La configuration en bêta sur le carbone 24 s'explique par la relation symbiotique de l'insecte avec des champignons dont il absorbe les productions stéroliques à configuration bêta (Maurer & al., 1991; 1993). Dans les tissus de *Manduca sexta* (L.) (Lépidoptère, Sphingidae) pendant son passage du stade pupal au stade adulte les hormones de mue sont toutes des formes hydroxylées de l'ecdysone: ecdysone, 20-hydroxyecdysone, 26-hydroxyecdysone, 20,26-dihydroxyecdysone et leurs 3alpha-épimères correspondants (Kaplanis & al., 1979; Thompson & al., 1984; Lozano & al., 1989). Les

insectes s'accomodent de sources alimentaires très variées. Leurs compositions stérolique et ecdystéroïdienne en sont alors souvent le reflet.

En ce qui concerne *Bombus terrestris*, on ne sait encore rien. Aucune analyse n'a encore été effectuée sur la nature des hormones de mue. Strambi a bien mis en évidence le stade de développement prépupal correspondant au taux maximum d'hormones de mue chez *Bombus terrestris*, mais sans préciser la nature des hormones (Strambi & al., 1984).

#### 4.1.7. Les vitamines

Les vitamines, sont des substances organiques présentes sous forme de traces. La plupart essentielles pour les insectes, elles forment souvent les éléments de constructions importants des co-enzymes (Lehninger, 1981). Elles se répartissent en deux groupes, les vitamines liposolubles et les vitamines hydrosolubles.

Parmi ces dernières on trouve la carnitine, la thiamine (vit.B1), la riboflavine (vit.B2), l'acide pantothénique (vit. B3), la pyridoxine (vit.B6), la cyanocobalamine (vit.B12), l'acide lipoïque, l'acide nicotinique (PP), la biotine (vit. H), l'acide folique (vit.B10) et l'acide ascorbique (vitamine C). Cette dernière est largement distribuée dans les tissus des insectes, ce qui indiquerait qu'elle y est synthétisée. Elle n'est donc pas un constituant essentiel excepté chez plusieurs insectes phytophages, comme par exemple *Bombyx mori* (Lépidoptère, Noctuidae) et *Schistocera gregaria* (Orthoptère, Acrididae) (Dadd, 1963; cité par Chapman, 1982). Chez *Apis mellifera*, la vitamine B6 est nécessaire pour obtenir un élevage normal des couvains et l'absence de vitamine B1 et B2 conduit à une réduction des durées de vie (Haydak & Dietz, 1972; Anderson & Dietz, 1976; Herbert & Shimanuki, 1978b).

Les vitamines liposolubles se composent des vitamines A, D, K et E. Ces vitamines ne semblent pas essentielles pour l'abeille domestique, mais l'addition des vitamines A et K ou

du complexe entier (Vitamines A, D, E et K) à un régime synthétique, double la quantité de couvain élevée (Herbert & Shimanuki, 1978a).

Enfin, le  $\beta$ -carotène (provitamine A) est probablement essentiel pour tous les insectes car il s'agit d'un composant du pigment visuel (Dadd, 1973; cité par Chapman, 1982).

#### 4.1.8. Les minéraux

Les minéraux contribuent au maintien de la balance ionique dans les cellules et agissent en tant que co-facteurs dans de nombreux systèmes enzymatiques. Les éléments essentiels connus sont le fer, le cuivre, le cobalt, l'iode, le manganèse, le zinc et le nickel (Chapman, 1982).

Le pollen constitue la principale source de minéraux dans l'alimentation de l'abeille domestique (entre 2,5 et 6,5% de cendres). Herbert (1979) évalua l'effet sur la production de couvains, de différents mélanges de minéraux ajoutés à une diète synthétique de l'abeille domestique (18 acides aminés, saccharose et 10 vitamines hydrosolubles [Herbert & Shimanuki, 1977]). Il obtint de meilleurs résultats avec 1% (en poids) de "*Beltsville ash mixture*" (en g/kg de cendre:  $\text{CaCO}_3$  (83,2),  $\text{MgSO}_4$  (105,6),  $\text{NaCl}$  (5,6),  $\text{ZnSO}_4$  (9,9), Phosphate de K dibasique (204,2),  $\text{CuSO}_4$  (1,9),  $\text{FeSO}_4$  (12,9),  $\text{MnSO}_4$  (3,4)) et cellulose (573,2) où la balance Ca/K = 0,5 qu'avec 1% de cendre de pollen ou de "*Wesson's salt mixture*" (mélange commercial de Cu, Fe, Mn, Zn, Mg, Ca, Na et K destiné aux vertébrés) où la balance Ca/K = 3.

Enfin, le cobalt, ajouté à l'alimentation de colonies d'abeilles domestiques à une concentration de 8 mg/l de sirop, entraîne une consommation de nourriture plus importante par les larves qui se transforment en cocons plus gros avec des glandes hypopharyngiennes plus développées (Yakovlev, 1969).

#### 4.1.9. Le pH

Afin d'assurer une activité catalytique maximale, le pH de l'intestin de l'abeille domestique doit être maintenu à un niveau relativement constant (Chauvin, 1962 cité par Herbert & Shimanuki, 1983).

Les pollens au pH 6,6; 4,7 ou 5,5 sont les plus appétents et le couvain plus abondant avec une alimentation à pH 4,7 et 5,5 (Herbert & Shimanuki, 1983).

#### 4.2. Les micro-organismes

Les micro-organismes sont ingérés occasionnellement avec la nourriture ou vivent en permanence dans l'intestin et les tissus (association constante). Dans ce cas, ils apportent à l'insecte les éléments nutritifs déficients dans une alimentation restreinte ou rendent possible la digestion (Chapman, 1982).

La présence de micro-organismes hôtes peut être à l'origine de variations dans les besoins diététiques entre insectes, mais ces différences sont aussi le reflet de la capacité de l'insecte à synthétiser, à métaboliser les nutriments différemment ou à les accumuler sous forme de réserves à des stades de développement antérieurs (Chapman, 1982).

L'influence de la présence de micro-organismes sur la qualité des aliments stockés a également été montrée. Selon Gilliam, les micro-organismes jouent un rôle fondamental dans les modifications du pollen stocké par les abeilles domestiques: dégradations des protéines et conversions métaboliques. La présence de levures dans le pollen stocké dans la ruche et le pain d'abeille domestique est confirmée (Gilliam, 1979). D'après les résultats des analyses

effectuées par la firme Pollitech, des levures existent également dans le pollen stocké par *Bombus terrestris* (Rasmont, com. pers.).

### 5. *Bombus terrestris* (L.), *Apis mellifera* L. et l'arbousier

L'arbousier est un arbre qui pousse dans tout le pourtour de la Méditerranée. Dans le massif des Maures (Sud de la France), sa période de floraison coïncide avec la génération d'hiver de *Bombus terrestris* (L.) (Duhayon & Rasmont, 1993). Il y est la principale source de nourriture pour les bourdons durant tout l'hiver (Rasmont, 1985). Abeilles et bourdons visitent les fleurs d'arbousier mais, tandis que les bourdons en récoltent le pollen et le nectar, *Apis mellifera* se contente de butiner le nectar et délaisse le pollen (Rasmont & al., 1994).

Cette différence de comportement alimentaire entre les deux insectes a incité à faire l'analyse des constituants du pollen et du nectar d'arbousier afin de mettre en évidence de possibles différences de composition chimique par rapport aux pollens et nectars des plantes habituellement pollinisées par l'abeille domestique. Les teneurs en protéines, minéraux, hydrates de carbone et stérols du pollen et nectar d'arbousier ont été comparées avec celles de pollens récoltés par *Apis mellifera* (Marot, 1992; Viville, 1992; Rasmont & al., 1994).

Aucune différence significative n'a été mise en évidence excepté au niveau de la teneur en stérols. En effet, Le pollen d'arbousier est très riche en  $\beta$ -sitostérol (près de 40% des stérols totaux), à l'inverse, pauvre en 24-méthylènecholestérol (moins de 3%) (Viville, 1992). Par contre, la teneur en 24-méthylènecholestérol + campestérol dans l'échantillon des pollens récoltés par l'abeille domestique est beaucoup plus élevée (près de 30 %) (Simal & al., 1988) (tableau III). Le 24-méthylènecholestérol est abondamment consommé et utilisé par l'abeille domestique pour élever son couvain dont il augmente la quantité et la longévité. Le  $\beta$ -sitostérol, par contre est consommé en plus faible quantité par l'abeille domestique (Herbert & Shimanuki, 1980; Svoboda & al., 1980; Svoboda & al., 1991). Ceci pourrait expliquer en partie l'indifférence d'*Apis mellifera* pour le pollen d'arbousier inadapté à ses besoins. A l'opposé, ce pollen très riche en  $\beta$ -sitostérol est de toute évidence adapté aux besoins de *Bombus terrestris*. En effet, les colonies de bourdons s'en nourrissent pendant toute leur génération d'hiver et semblent se développer normalement.

**Tableau III. Comparaison entre la composition stérolique moyenne de 35 pollens récoltés par *Apis mellifera* et la composition stérolique du pollen d'arbousier récolté par *Bombus terrestris*. D'après Simal & al. (1988) et Viville (1992). (Camp.+24-Méth. Chol.: campestérol + 24-méthylènecholestérol) \*: extrait étheré total et fraction insaponifiable d'un pollen commercial séché.**

	Pollen d' <i>Arbutus</i> <i>unedo</i>	35 pollens d'abeilles domestiques
Cholestérol	0,83%	4%
Brassicastérol	0,35	-
Camp.+ 24-Méth. Chol.	2,46 %	29,8%
Stigmastérol	0,38%	-
$\Delta$ 7-campestérol	-	-
$\beta$ -sitostérol	38,17%	16,7%
Stigmastanol	0,34%	-
$\Delta$ 5-avénastérol	18,69%	46,4%
$\Delta$ 7-stigmastérol	9%	-
$\Delta$ 7-avénastérol	22,33%	1,2%
Autres	7,79%	1,9%
Stérols totaux mg/g M.F.	3,55	1,44%*

Ce fait particulier est à l'origine de notre étude des besoins en stérols de *Bombus terrestris* (L.).

## **II. OBJECTIF DU TRAVAIL**



Aucune recherche sur l'importance des stérols dans l'alimentation n'avait encore été réalisée pour *Bombus terrestris*. Pourtant l'intérêt économique et écologique de cet insecte la justifie. En effet, comprendre les choix alimentaires des bourdons doit permettre d'une part d'améliorer les pratiques d'élevage de *Bombus terrestris* et d'autre part de mieux expliquer les interactions de l'espèce avec son environnement.

Une telle étude nécessite avant tout la mise au point de tests nutritionnels adaptés à l'insecte. Il est nécessaire de définir une méthode basée sur l'évaluation de la productivité de colonies orphelines, de la durée de vie et de la taille d'individus mâles qui en émergent en fonction de l'alimentation. Cette méthode doit s'accompagner d'un test d'appétence. Une fois les méthodes mises au point, il est possible d'étudier les effets des stérols sur *Bombus terrestris*. En l'absence d'une alimentation de base synthétique adaptée aux bourdons, ceux-ci reçoivent un régime alimentaire naturel composé de pollen frais supplémenté en stérol.

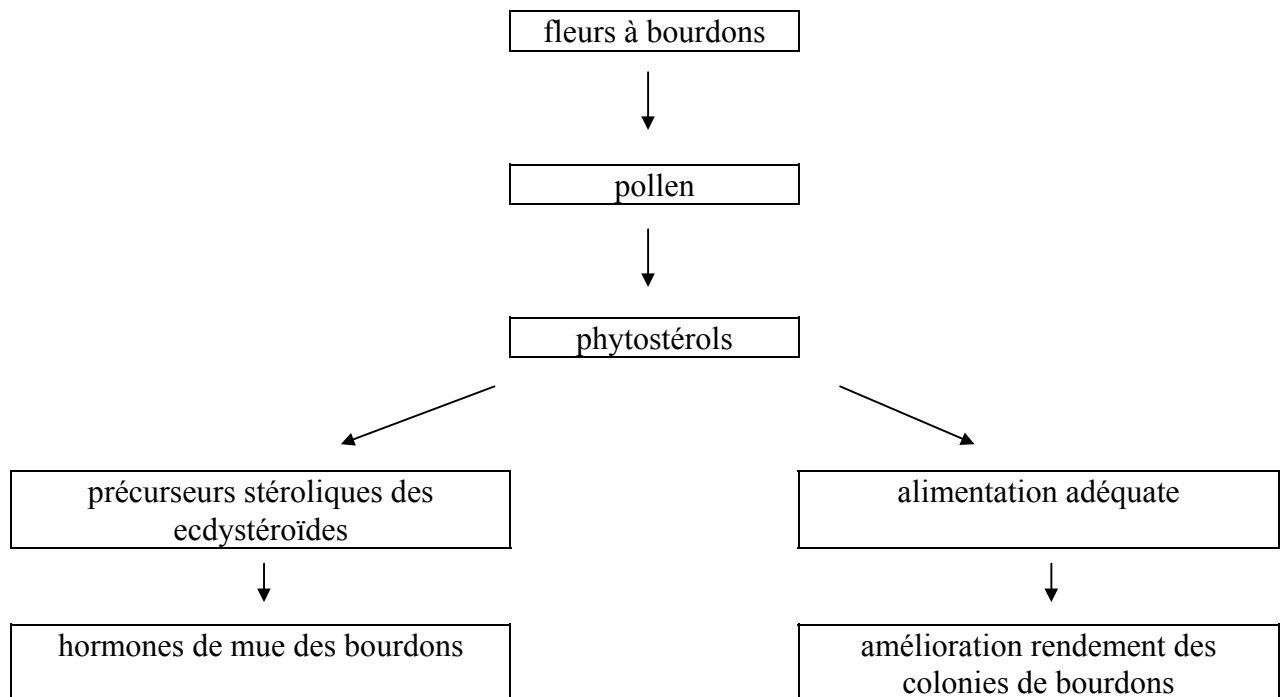
Après avoir déterminé la nature des phytostérols les plus représentés dans l'alimentation naturelle des bourdons, il est possible, grâce aux méthodes mises au point, d'étudier les conséquences sur le rendement de colonies orphelines de *Bombus terrestris* de suppléments en ces stérols ainsi que leur appétence.

Nous devons nous focaliser sur les stérols disponibles commercialement qui comptent aussi parmi les plus intéressants à étudier pour leur rôle dans l'alimentation des bourdons. Ce sont le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol et le cholestérol. Le  $\beta$ -sitostérol représente près de 40 % des stérols totaux du pollen d'arbousier (*Arbutus unedo* L.) (Viville, 1992) qui est la principale source de nourriture pour *Bombus terrestris* dans le Massif des Maures en hiver. Le stigmastérol est également un phytostérol abondant dans le règne végétal, il sert de précurseur à la synthèse du cholestérol chez certains insectes (Svoboda & Weirich, 1995) (fig. 8). Enfin, malgré sa présence minoritaire dans la plupart des pollens (Simal & al., 1988), le cholestérol joue un rôle primordial chez la plupart des insectes.

Finale­ment, afin de mieux com­pre­n­dre le mé­ta­bol­isme des sté­rols, nous com­par­er­ons la com­po­si­tion en sté­rols des corps de *Bombus terrestris* et *Apis mellifera*. Nous étu­di­er­ons l'in­fl­u­en­ce de dif­fé­ren­tes sup­plé­men­ta­tions sté­ro­li­ques sur le mé­ta­bol­isme des sté­rols et des hor­mones de mues des bour­dons. En effet, les sté­rols ont un rôle de pré­cur­seurs des hor­mones sté­roï­des. La con­na­is­san­ce de ces der­nières nous per­met­trait de remon­ter en aval dans le par­cours mé­ta­bol­ique des pré­cur­seurs sté­ro­li­ques. De plus, con­traire­ment à l'abeille, il n'ex­iste au­cune an­alyse des hor­mones de mue chez *Bombus terrestris*. Nous ne sa­vons pas si, com­me chez l'abeille domes­tique, il y a une hor­mone de mue prin­ci­pale à 28 car­bones, ni si sa na­ture reflète celle des sté­rols com­po­san­ l'alimen­ta­tion.

En ré­sumé, notre ob­jec­tif est double. D'un point de vue ap­pli­qué, nous espé­r­ons don­ner la pos­si­bil­ité d'aug­men­ter le ren­de­ment des colonies de *Bombus terrestris* éle­vées pour la pol­lin­isa­tion di­ri­gée in­dus­trielle en amé­li­orant leur alimen­ta­tion. Plus fon­da­men­ta­le­ment, nous vou­lons dé­buter l'é­tu­de du mé­ta­bol­isme sté­ro­li­que et ecdys­té­roï­dien de *Bombus terrestris* afin de mieux con­naître ses be­soins essen­tiels en sté­rols et ses choix alimen­tai­res lors du butinage.

Nos parcours déductifs peuvent-êtré schématisés comme suit:



### **III. MATERIEL ET METHODES**

# **1. Analyses stéroliques de pollens récoltés par les bourdons comparaison avec des pollens récoltés par les abeilles domestiques**

## **1.1. Introduction**

L'objectif de ces méthodes est d'analyser les stérols des pollens récoltés par les abeilles domestiques et par les bourdons puis de les comparer.

Les pollens étudiés ont été choisis en fonction des relations, principalement monolectiques, que les plantes dont ils sont issus ont avec les bourdons (Proctor & Yeo, 1973; Rasmont, 1988).

## **1.2. Situation géographique des sites de capture des bourdons et description des plantes**

### 1.2.1. Pollen d'*Arbutus unedo* L. et de *Salpichroa origanifolia* (Lam.)

Les pollens d'arbousier (*Arbutus unedo* L.) et de *Salpichroa origanifolia* (Lam.) ont tous deux été récoltés en France, dans le département du Var, en décembre 1992.

*Arbutus unedo* L. est une Ericacée répartie dans le S.O. de l'Europe et la région Méditerranéenne, dans l'Ouest de l'Amérique du Nord et du Mexique. On la retrouve également dans de nombreux postes avancés tels que la région atlantique de la France, le Sud-Ouest de l'Irlande, les pays du Sud et du Centre de l'Atlas, la Syrie, la Palestine, les Balkans et l'Anatolie (Rikli, 1943). Elle pousse sur les terrains secs, acides à neutres, parfois jusqu'à la base de l'étage montagnard, dans les bois clairs, les maquis et les dunes boisées (Dupont, 1990). Elle fleurit d'octobre à mars. Elle constitue l'unique ressource alimentaire de

*Bombus terrestris* durant toute la génération d'hiver de l'espèce dans le massif des Maures, *Bombus terrestris* est son pollinisateur principal (Rasmont, 1985).

Situation géographique de la récolte: *Arbutus unedo* L., France, département du Var, massif des Maures, Jas de la Moute, U.T.M.: KN8896.

*Salpichroa origanifolia* (Lam.) est une espèce originaire de la partie méridionale de l'Amérique du Sud (Bolivie, sud du Brésil, Paraguay, Uruguay, Argentine). On la trouve également (importée) en Amérique du Nord, en Europe (Croatie, Italie, Sud de la France, Espagne, Maroc) en Afrique et en Australie. Commune dans le sud de la France, elle y pousse en bordure des routes, sur les terrains vagues à proximité du littoral méditerranéen ou du sud du littoral Atlantique (de Cugnac, 1931; de Litardière, 1955; Purdie, 1982; Stace, 1991). Cette Solanacée est une des rares plantes en fleur durant le mois de décembre dans le Var. Elle y est pollinisée activement par *Apis mellifera* et par *Bombus terrestris* pendant l'hiver.

Situation géographique de la récolte: *Salpichroa origanifolia* (Lam.), France, département du Var, Hyères, U.T.M.: KN6566.

### 1.2.2. Pollen de *Solanum lycopersicum* Dombito

Le pollen de *Solanum lycopersicum* Dombito analysé provient d'un don du Professeur F.J. Jacobs (Universiteit Gent).

En serre, les bourdons, à cause de leur situation, ont une relation monolectique obligée avec les plants de tomates qui sont leur unique ressource alimentaire.

### 1.2.3. Pollen de *Cerinth minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.)

Le pollen de mélinet (*Cerinth minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.)) a été récolté en France, dans le département des Alpes-de-Haute-Provence au col d'Allos, en juillet 1993.

*Cerinth minor* L. pousse dans les pâturages et bois des montagnes. On le trouve en France (dans les Alpes de Savoie, du Dauphiné, de Provence), en Europe centrale et orientale, en Asie occidentale jusqu'en Perse. Il fleurit de mai à août.

Plusieurs espèces de bourdons butinaient la plante, *Bombus* (*Pyrobombus*) *brodmannicus delmasi* (Tkalcu), *B.* (*Rhodobombus*) *mesomelas* Gerstaecker, *B.* (*Pyrobombus*) *pratorum* (L.) et *B.* (*Thoracobombus*) *runderarius* (Müller).

Situation géographique de la récolte: *Cerinth minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.), France, département des Alpes-de-Haute-Provence, col d'Allos, 2240 m, U.T.M.: LQ0407.

### 1.2.4. Pollen d'*Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach)

Le pollen d'aconit (*Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach)) a été collecté en France, dans les Pyrénées orientales, en août 1993 par P. Rasmont et S. Rousseau.

Les aconits sont réparties en Europe, Asie et Amérique du Nord. *Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach) pousse dans les bois et prés humides des montagnes, elle fleurit de juin à août.

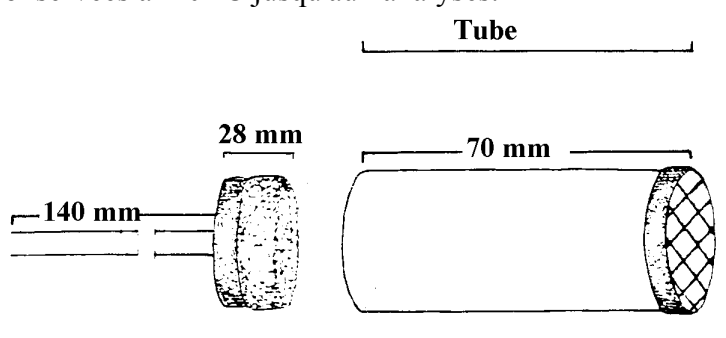
En France, les espèces du genre *Aconitum* sont principalement pollinisées par trois espèces de bourdons, *Bombus hortorum hortorum* (L.), *B.* (*Megabombus*) *gerstaeckeri* Morawitz et *B.* (*Alpigenobombus*) *wurfleini pyrenaicus* Vogt. Le pollen a été prélevé des

corbeilles des pattes postérieures de *B. gerstaeckeri* Morawitz qui est une espèce oligolectique de l'aconit (Rasmont, 1988; Rousseau, 1994).

Situation géographique de la récolte: *Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach) France, Pyrénées orientales, Nohèdes, col de Portus, U.T.M.: DH3719.

### 1.3. Méthode de récolte des pollens

Les bourdons occupés à polliniser la plante dont on désire analyser le pollen, sont capturés au filet et immobilisés dans un cylindre de contention (fig. 9). Les pelotes de pollen, accrochées aux corbeilles des pattes postérieures, sont ôtées avec une paire de brucelles puis conservées à -20 °C jusqu'aux analyses.



**Figure 9.** Dessin du cylindre de contention (Kwak, 1987).

Le pollen récolté par *Apis mellifera* est recueilli par l'intermédiaire de trappes à pollen posées à l'entrée des ruches. Le pollen ainsi obtenu est multifloral. Les pelotes sont triées de manière à ne conserver que celles des variétés florales qui nous intéressent.

### 1.4. Analyse stérolique des pollens (Lognay & al., 1989; 1992)

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

### Saponification



Cette opération vise à séparer la partie insaponifiable, contenant les stérols, de la partie saponifiable qu'on élimine.

Avant saponification, si les quantités disponibles sont suffisantes, le pollen est lyophilisé. Il est ensuite scindé en plusieurs échantillons saponifiés en présence de 20 ml de KOH méthanolique 2N à 80°C pendant 1 heure. Après refroidissement et addition du standard interne (une solution éthanolique de bétuline (0,25 mg/ml)) les solutions sont diluées avec 20 ml d'eau distillée.

### **Extraction**

Ces solutions hydroalcooliques sont extraites 3 fois avec 20 ml d'éther diéthylique. Cette opération terminée, les extraits étherés (transparents) contenant l'insaponifiable sont lavés avec 3 fois 20 ml d'eau distillée puis séchés sur sulfate de sodium anhydre pendant 24 heures à l'obscurité.

### **Chromatographie sur couche mince**

Au cours de la chromatographie d'adsorption sur couche mince, la partie insaponifiable est séparée en ses constituants.

Chaque extrait étheré est séché par ajout de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre puis filtré, concentré sous vide et repris par 1 ml de chloroforme puis fractionné par chromatographie préparative sur couche mince. Après élution (éluant: chloroforme/éther diéthylique/ammoniaque 90:10:0,5 v/v/v), révélation par pulvérisation de 2,7-dichlorofluorescéine à 0,2 % dans l'éthanol et examen sous U.V. (254 nm), les bandes correspondant aux stérols (R<sub>f</sub>= 0,45) seront récupérées et les stérols réextraits trois fois avec respectivement 5 ml, 3 ml et 3 ml de chloroforme. Le solvant est ensuite éliminé par évaporation sous N<sub>2</sub>. Les stérols obtenus sont silylés.

### **Silylation**

La réaction est effectuée pendant 30 minutes à 90 °C en présence de 100 µl d'un mélange 1:1 v/v de pyridine anhydre et du réactif de silylation (BSTFA + 1% TMCS: bis-

silyltrifluoroacétamide contenant 1% de triméthylchlorosilane) puis analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

### **Chromatographie en phase gazeuse (CPG)**

Les stérols sont quantifiés par rapport à une quantité connue de bétuline ajoutée comme étalon interne. Le facteur de réponse des stérols par rapport à la bétuline vaut 1 (Lognay & al., 1992). Les identifications sont réalisées par comparaison des temps de rétention ( $t_r$ ) et des temps de rétention relatifs ( $t'_r$ , calculés par rapport au  $\beta$ -sitostérol) des stérols de pollen avec ceux d'une huile de tournesol prise comme référence (composition stérolique connue avec certitude). Le brassicastérol quant à lui est identifié selon la même technique au départ d'huile de colza.

Conditions d'analyse: Appareil Carlo Erba Mega 5160. Colonne CP-Sil 19CB (Chrompack L=25 m, I.D.=0,32 mm, df=0,2  $\mu$ m). Gaz vecteur: Helium 70 KPa (1,2 ml/min). Injection "on-column" à 60 °C puis programmation de T° jusqu'à 275 °C (30 min). Détecteur FID à 300°C.

### **Analyse GC-MS**

Afin de vérifier les identifications effectuées à partir des données de rétention mesurées en CPG, chaque fois que possible, les échantillons sont soumis à une analyse en chromatographie gazeuse couplée à une spectrométrie de masse (GC-MS).

Conditions d'analyse: identiques aux précédentes excepté pour l'appareillage (Hewlett Packard HP5989, E.I mode à 70 e V, source à 200 °C) et la colonne (HP-5; L= 30 m, I.D.=0,25 mm, df=0,2  $\mu$ m).

## 2. Tests sur la qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, du cholestérol et du stigmastérol

### 2.1. Introduction

L'élaboration d'une méthode grâce à laquelle on peut analyser les effets de différents stérols sur *Bombus terrestris* constitue une étape obligée de notre travail. En effet, aucune méthode n'ayant été décrite pour *Bombus terrestris*, nous nous sommes dans un premier temps référée aux travaux publiés sur *Apis mellifera*. Dans l'abondante littérature consacrée aux besoins nutritionnels d'*Apis mellifera* (De Groot, 1953; Haydak & Dietz, 1972; Herbert & Shimanuki, 1977; Herbert & al., 1977a; Barker & Lehner, 1978, entre autres), les auteurs suivent le plus souvent la méthodologie décrite par De Groot (1953). Ce dernier prélève dans des colonies d'abeilles domestiques des nymphes d'ouvrières prêtes à émerger, les met à incuber puis récupère les individus émergés pour les placer par groupe de 50 dans une cage. Il utilise le développement des glandes hypopharyngiennes et la durée de vie de ces ouvrières engagées comme paramètre estimateur de la qualité nutritive des aliments étudiés. Les glandes hypopharyngiennes des ouvrières d'abeilles domestiques produisent, en partie, la gelée royale destinée à nourrir les larves et les reines. Elles ne se développent que si l'ouvrière consomme du pollen ou un autre nutriment azoté. Elles sont de ce fait étroitement liées à la qualité et à la quantité de nourriture ingérée (Soudek, 1927; Kratky, 1931; Currie, 1932; Peterka, 1939; Lotmar, 1939; Svoboda, 1940 et Maurizio, 1950, 1951 cités par De Groot, 1953).

Un autre paramètre souvent utilisé chez *Apis mellifera* est le nombre ou la surface totale de cellules de couvain operculées, ce qui caractérise la capacité d'élevage des larves (Herbert & al., 1980). Celle-ci dépend également de la qualité et de la quantité d'aliments.

Ces méthodes sont inadaptées à l'étude des effets de la nourriture chez *Bombus terrestris*. Leurs larves ne sont pas nourries par des sécrétions hypopharyngiennes mais par du pollen et du nectar et ce dès leur plus jeune âge (Alford, 1975). Les glandes hypopharyngiennes n'ont pas de rôle alimentaire, elles sécrètent uniquement des enzymes salivaires et leur taille n'est pas influencée par la qualité nutritive d'un aliment (Alford, 1975). Il n'est donc pas possible d'utiliser leur conformation pour estimer la qualité de l'alimentation.

En ce qui concerne la durée de vie d'ouvrières engagées, des problèmes particuliers se posent. Au sein d'une colonie de *Bombus terrestris*, il existe une grande hétérogénéité morphologique parmi les ouvrières. Il pourrait donc y avoir des différences de durée de vie et de fécondité découlant de cette hétérogénéité, avec le risque de masquer les possibilités d'estimation du régime alimentaire par une importante variabilité statistique.

Enfin, chez *Bombus terrestris*, le couvain ne se présente pas sous forme d'alvéoles facilement dénombrables, ce qui complique ou empêche la mesure de surface de couvain operculé.

Il est donc indispensable de mettre au point une méthode nouvelle avant d'aborder l'étude des besoins nutritionnels de *Bombus terrestris*.

La méthode mise au point semble adaptée à l'étude des besoins nutritionnels de *Bombus terrestris* puisqu'elle permet de mesurer d'une manière efficace les différences de qualité entre deux régimes alimentaires (Regali & Rasmont, 1995).

Le principe général est de constituer de petites colonies orphelines de *Bombus terrestris* nourries chacune exclusivement avec les aliments étudiés. Ainsi séparés de leur reine, les ouvrières retrouvent leur fertilité et constituent très rapidement un couvain constitué uniquement de mâles haploïdes issus de femelles non fécondées. Les mâles issus de telles

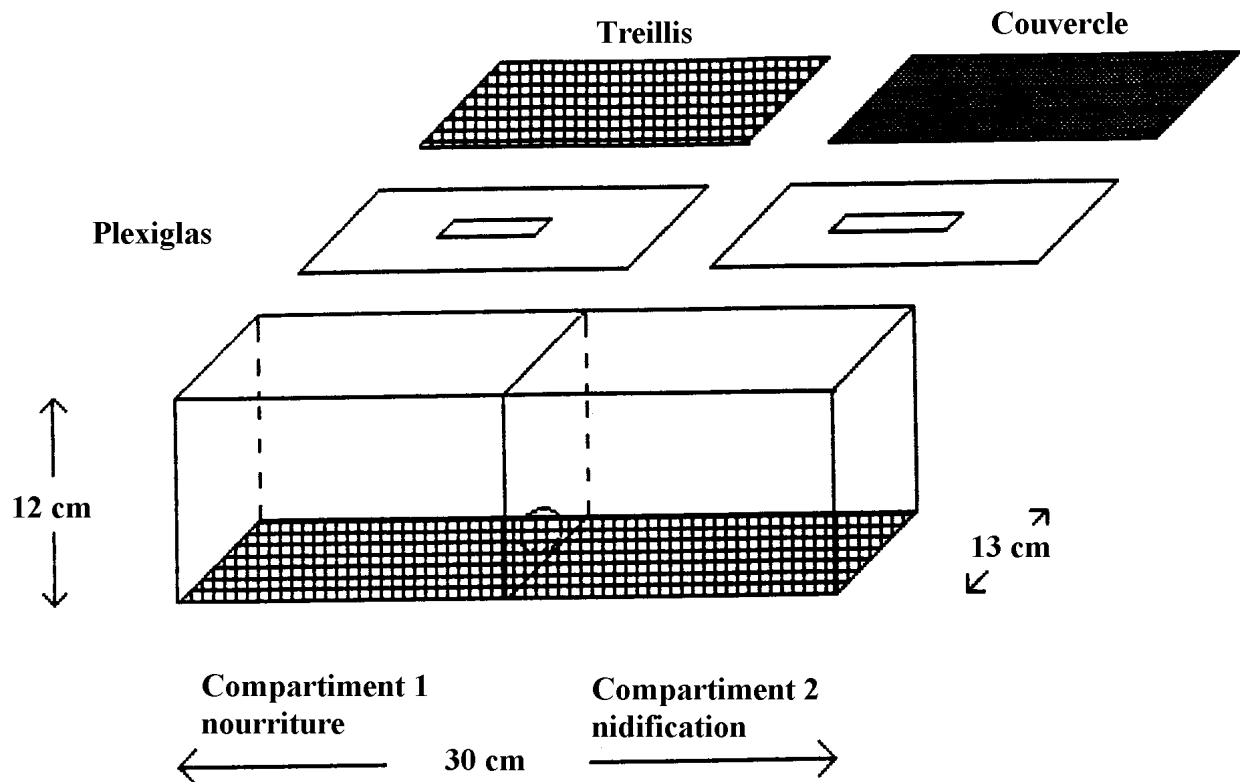
colonies ayant été exclusivement nourris depuis leur premier stade larvaire au moyen du régime alimentaire étudié, leur taille, la précocité de leur émergence et leur durée de vie devraient refléter la valeur nutritive de celui-ci (Regali & Rasmont, 1995). C'est cette méthode qui est utilisée ici pour tester l'effet de suppléments en phytostérols sur nos colonies orphelines de *Bombus terrestris*.

## **2.2. Conditions d'élevage**

### 2.2.1. Matériel d'expérimentation

Le matériel d'élevage en laboratoire des bourdons se compose de deux types de boîtes d'expérimentation.

Les colonies parentales sont élevées dans des boîtes en plastique à un seul compartiment recouvert d'un cache amovible (fig. 10). Le plancher est recouvert d'émailène excepté aux quatre coins où il est perforé pour laisser passer les déchets de la colonie. Sur le plancher, on dépose deux coupelles de pollen de 4 cm de diamètre et un nourrisseur à sirop.



**Figure 11.** Dessin de la boîte d'élevage des colonies orphelines.

Les colonies orphelines (issues des colonies parentales) sont placées dans des boîtes d'élevage en bois, divisées chacune en deux compartiments de mêmes dimensions communiquant entre eux par une ouverture pratiquée dans la plaque de séparation. Cette ouverture est suffisamment grande pour permettre le libre passage des bourdons d'un compartiment à l'autre. L'un des deux compartiments est couvert par un cache amovible (compartiment à nidification) et l'autre par un treillis amovible lesté (compartiment à nourriture). Dans ce dernier compartiment, on place des coupelles à pollen de 4 cm de diamètre et, comme nourrisseurs à sirop, des piluliers à capsule trouée retournés sur un support en treillis. Les ouvrières pondent dans l'autre compartiment (compartiment à nidification) où a été déposé un morceau de cire parentale. Le plancher de chaque boîte est en treillis laissant passer les déchets de la colonie qui sont ainsi évacués. Ce modèle de boîte a été mis au point par le Dr. R. de Jonghe pour des expériences d'hybridation (de Jonghe, 1982; de Jonghe & Rasmont, 1983) (fig. 11).

### 2.2.2. Elaboration et conservation de l'alimentation

Les pollens utilisés pour nourrir les bourdons sont frais et conservés par congélation. Ils sont fournis par les sociétés Ruchers du Centre et Percie du Sert en France. Ils sont obtenus grâce à des trappes à pollen placées à l'entrée des ruches d'abeilles domestiques. La composition floristique des pollens est déterminée au C.A.R.I (Centre Apicole de Recherche et d'Information, Louvain-La-Neuve, Belgique) par identification botanique et par comptage des grains à l'hémacytomètre sous microscope optique. Une correction volumétrique en fonction de la taille moyenne des pollens en présence est effectuée. L'analyse de la teneur en stérols du pollen par chromatographie gazeuse a été effectuée en collaboration avec l'U.E.R. de Chimie Générale et Organique de la Faculté des Sciences Agronomique de Gembloux (Lognay & al., 1992). Pour compléter le régime alimentaire, on fournit aux bourdons une source de glucides sous la forme d'une solution de saccharose (50% Poids/Volume) dont le pH a été ajusté à 4,7 par addition d'acide citrique.

### 2.2.3. Elevage des colonies parentales

Les colonies utilisées pour les expériences sont issues principalement de reines de *Bombus terrestris* (L.) capturées dans le Hainaut (Belgique) ou dans le Languedoc-Roussillon (France). La mise en ponte et l'élevage des reines ont été effectués dans notre laboratoire. Toutes les colonies sont maintenues dans une salle d'élevage climatisée à une température de 29°C et à une humidité relative de 80%. La pièce est éclairée en lumière rouge ce qui permet l'observation des colonies sans perturber leur activité. Les aliments sont renouvelés tous les deux jours.

### 2.2.4. Elevage des colonies orphelines



Des amas de cocons contenant des nymphes d'ouvrières prêtes à émerger sont prélevés au hasard dans les colonies parentales et déposés dans une couveuse où la température (33°C) et l'humidité relative (60%) se rapprochent de celles régnant à l'intérieur des nids. L'opération est renouvelée chaque fois que tous les cocons sont éclos ou quand il n'y a plus eu d'éclosion pendant plusieurs jours.

A chaque émergence de 5 ouvrières, celles-ci sont placées dans une des boîtes d'élevage décrites ci-dessus (fig. 11) avec un morceau de cire parentale comme stimulant social. Elles forment ainsi une colonie orpheline.

### **2.3. Présentation détaillée du test de qualité nutritionnelle**

On forme tout d'abord un minimum de six colonies orphelines par régime alimentaire testé. Les ouvrières qui les composent sont laissées à jeûner pendant une heure afin qu'elles éliminent les aliments qui pourraient subsister dans leur tractus digestif. L'expérience montre que le délai d'une heure est suffisant et qu'un prolongement de celui-ci augmente fortement la mortalité. Ceci marque le début du test alimentaire.

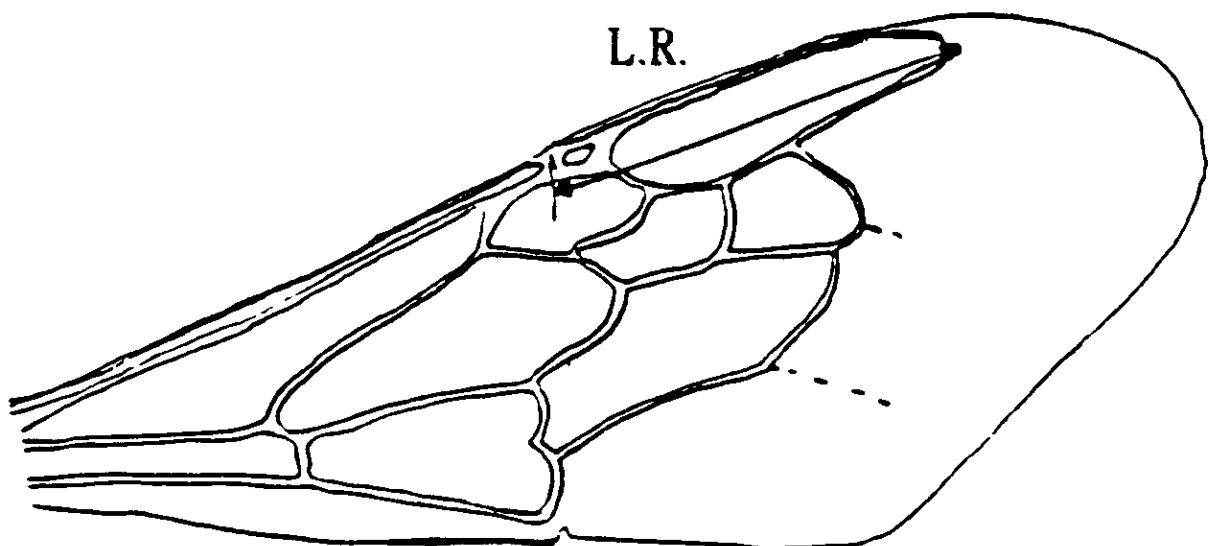
Au contraire de ce qui est pratiqué par Herbert et al. au cours de leurs expériences sur *Apis mellifera* (Herbert & al. 1980), la nourriture n'est pas fournie *ad libitum* aux colonies orphelines. En effet, afin de différencier l'effet sur les paramètres mesurés de l'appétitivité et de la valeur nutritive du régime alimentaire testé, nous avons opté pour un mode d'alimentation rationné. Ainsi, des rations pesées et renouvelées tous les deux jours sont distribuées aux colonies orphelines. Ces rations sont établies de telle façon qu'elles soient entièrement consommées en deux jours.

Les boîtes sont permutées tous les jours afin de régulariser l'effet social entre les colonies orphelines en minimisant l'effet de bord.

Les paramètres biométriques sont mesurés sur la progéniture des ouvrières, c'est-à-dire sur des bourdons mâles ayant été exclusivement nourris depuis leur premier stade larvaire au moyen du régime alimentaire étudié. Les paramètres mesurés pendant les 65 ou 100 jours de l'expérience sont:

- la durée de vie de chacun des mâles émergés endéans les 65 ou 100 jours;
- la longueur radiale (L.R.) de l'aile antérieure droite de tous les bourdons mâles morts (fig.12), (ce dernier paramètre est représentatif de la taille du bourdon selon Medler, 1962);
- la durée de la période précédant l'émergence des mâles;
- le nombre de mâles émergés en 65 ou 100 jours;
- la durée de la période précédant la formation du premier cocon.

Les mâles nouvellement émergés sont numérotés à l'aide d'une pastille collée sur le mésonotum (Kwak, 1987). La distance correspondant à la longueur radiale (L.R.) de l'aile antérieure droite de chaque mâle est mesurée sous une loupe binoculaire équipée d'un micromètre oculaire.



**Figure 12.** Dessin de l'aile antérieure droite de *Bombus terrestris*. LR Longueur Radiale: distance allant de la base de la veinule de la première cellule submarginale jusqu'à l'apex de la cellule radiale (Medler, 1962).

### 2.3.1. Détail des régimes alimentaires testés

Trois mélanges de pollens de qualités différentes, fournis par la société des Ruchers du Centre (France) et conservés par congélation servent de base aux régimes alimentaires testés. Il s'agit de mélanges composés majoritairement de pollen dit de "colza" (lot A), de pollen dit de "tournesol" (lot B) pour l'étude de la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol et de pollen dit de "saule" (lot C) pour l'étude des supplémentations en cholestérol et stigmastérol (tableaux VI, VII).

Pour compléter le régime alimentaire, nous fournissons aux bourdons une source de glucides sous la forme d'une solution de saccharose (50% Poids/Volume) dont le pH a été ajusté à 4,7 par addition d'acide citrique. Les mélanges de pollens ont été broyés au pilon avant d'être supplémentés de 0,3 % en poids des stérols à tester. Cette quantité a été calculée par rapport à la teneur moyenne en stérols totaux contenus dans différents pollens: soit entre 0,1 et 0,4% (Stanley & Linskens, 1974). La répartition homogène de la supplémentation dans les mélanges de pollens a été vérifiée par la méthode décrite au point 1.4.

### 2.3.2. Supplémentation en $\beta$ -sitostérol

0,3 % de  $\beta$ -sitostérol (pur à 90 %, plus 8 % de campestérol et 1 % d' $\alpha$ -sitostérol, don de la firme Caldic) ont été ajoutés à deux mélanges de pollens différents: un mélange riche en pollen de colza (lot A) et un mélange riche en pollen de tournesol (lot B) (tableau V). Le lot A, colza, est riche en protéines (22 %) et en stérols à 28 carbones (tableau VI). Tandis que le lot B, tournesol, est une alimentation plus pauvre en protéines (13 %) et en stérols à 28 carbones.

### 2.3.3. Supplémentation en cholestérol et en stigmastérol

Dans ces expériences, nous avons apporté une modification majeure par rapport au test du  $\beta$ -sitostérol. Plutôt qu'un mélange de pollens de composition en stérols peu contrôlée et non reproductible (tel que les lots A et B utilisés précédemment), nous avons choisi comme base de supplémentation un pollen monofloral (le pollen de saule dans lequel le 24-méthylènecholestérol représente à lui seul plus de 60 % des stérols totaux et le cholestérol moins de 1%). Le pollen de saule a été enrichi en cholestérol (pur à 99 % fourni par la firme Acros-Chimica) ou en stigmastérol (pur à 95 % fourni par la firme Acros-Chimica) puis homogénéisé.

## 2.4. Méthodes statistiques

Les méthodes statistiques employées pour traiter les résultats des tests sur la qualité nutritionnelle sont l'analyse de la variance à trois et deux critères en blocs aléatoires incomplets. Ce type d'analyse apporte beaucoup de précision, elle convient bien à une grande quantité de données et permet de comparer les résultats à plusieurs niveaux de variations (pollen, stérol et colonies) (Dagnelie, 1975a; 1975b).

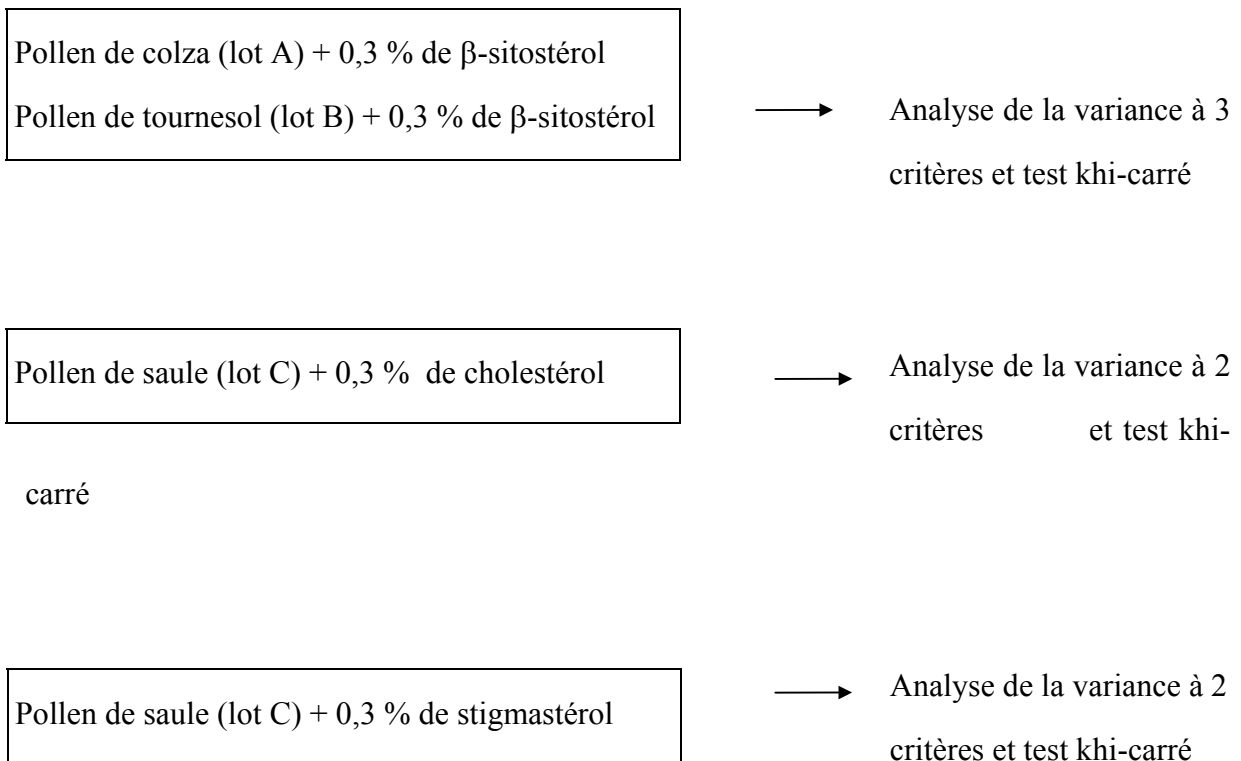
Les blocs (qui représentent la variabilité aléatoire maximale) ont été définis suivant les dates d'établissement des colonies orphelines.

Les résultats concernant les durées de la période précédant l'apparition des premiers cocons et le nombre de mâles émergés, de part leur forme, ont fait l'objet d'un autre modèle de test statistique, le khi-carré (Siegel, 1956).

Nous avons testé cette hypothèse particulière ( $H_0$ ): la qualité du régime alimentaire n'a pas d'influence sur le moment d'apparition des premiers cocons, le nombre de bourdons

mâles émergés en 65 ou 100 jours, la durée de la période précédant leur émergence, la longueur de la cellule radiale de leur ailes antérieures droites et leur longévité.

## 2.5. Schéma récapitulatif des régimes alimentaires testés et des méthodes statistiques utilisées



carré

### **3. Tests d'appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol**

#### **3.1. Introduction**

Ces expériences nous renseignent sur l'appétabilité de 3 stérols floraux importants pour *Bombus terrestris*: le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol et le cholestérol dont la valeur nutritionnelle a aussi été testée.

#### **3.2. Conditions d'élevage**

Les conditions d'élevage des colonies ainsi que l'élaboration et la conservation de l'alimentation sont identiques à celles mises en oeuvre pour l'expérience sur la qualité nutritionnelle (voir point 2).

#### **3.3. Méthode d'expérimentation**

Cette méthode consiste à évaluer l'appétence en mesurant les quantités d'aliments consommés quotidiennement par des colonies de bourdons complètes (possédant une reine) nourries *ad libitum*.

Trois colonies comportant au moins 50 ouvrières sont utilisées pour chacune des expériences d'appétence. Des coupelles de 6 cm de diamètre contenant chacune un des régimes à tester et un nourrisseur rempli de sirop de saccharose sont déposés dans chaque colonie.

Tous les deux jours, on renouvelle les aliments et lorsqu'on retire les coupelles utilisées, on mesure la différence de poids frais correspondant à la quantité d'aliment ingérée. On répète au moins 5 fois cette mesure au cours du temps dans chaque colonie.

### **3.4. Régimes alimentaires testés**

Les régimes alimentaires testés sont identiques à ceux expérimentés au cours des tests sur la qualité nutritionnelle du  $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol (voir point 2). Ils ont été préparés en ajoutant différents stérols à une alimentation de base. Il s'agit de mélanges composés majoritairement de pollen de colza (lot A) et de pollen de tournesol (lot B) pour le premier test d'appétence du  $\beta$ -sitostérol et de pollen de saule (lot C) pour les tests d'appétence du cholestérol, du stigmastérol et le second test d'appétence du  $\beta$ -sitostérol (tableau V). Pour compléter le régime alimentaire, on fournit aux bourdons une source de glucides sous la forme d'une solution de saccharose (50% Poids/Volume) dont le pH a été ajusté à 4,7 par addition d'acide citrique.

Les mélanges de pollen ont été broyés au pilon et supplémentés de 0,3% en poids de cholestérol (pur à 99 %, Acros-Chimica), stigmastérol (pur à 95 %, Acros-Chimica) ou  $\beta$ -sitostérol (pur à 90 %, plus 8 % de campestérol et 1 % d' $\alpha$ -sitostérol; don de la firme Caldic) selon les cas puis homogénéisés.

### **3.5. Méthodes statistiques**

Pour traiter les résultats nous avons eu recours à l'analyse de la variance à deux critères en blocs aléatoires complets. Les deux critères sont d'une part les régimes alimentaires et d'autre part les blocs représentés chaque fois par une colonie (1 bloc = une colonie) (Dagnelie, 1975a; 1975b).



L'hypothèse particulière testée ( $H_0$ ) est la suivante: même comportement alimentaire vis-à-vis des différents régimes alimentaires testés.

## **4. Stérols corporels de *Bombus terrestris* (L.), comparaison avec la nature et la teneur des stérols contenus dans le corps d'abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.)**

### **4.1. Introduction**

L'objectif de cette expérience est de mettre en évidence les principaux stérols contenus dans les organismes des insectes, de comparer les sexes et les espèces entre elles et d'examiner si la composition en stérols de l'individu est fonction de la nature des stérols contenus dans son alimentation naturelle (pollen). Cette expérience devrait aussi nous fournir des indices sur les éventuelles différences de métabolisme entre *Bombus terrestris* et *Apis mellifera*.

### **4.2. Echantillonnage**

Les échantillons analysés sont formés de 2 fois 10 individus. Les bourdons mâles (*Bombus terrestris*) sont issus de colonies élevées en laboratoire et nourries d'un mélange de pollens à base de pollen de Fabacées (lot D) (voir annexe IX). Les reines de bourdons (*Bombus terrestris*) ont été capturées au filet, fin mars 1994, alors qu'elles butinaient des fleurs de saules (*Salix* sp.) dans la région de Mons, Belgique. Les ouvrières d'*Apis mellifera* L. ont été capturées à la sortie de leur ruche. Les insectes ont été tués puis conservés par congélation en attendant les analyses stéroliques.

### **4.3. Extraction des lipides totaux**

Les insectes sont débarrassés de leurs pattes et ailes avant d'être broyés. Les échantillons, répartis en deux lots de même poids, sont homogénéisés dans une solution chloroforme/méthanol (2:1 v/v) à raison de 20 ml/g de tissu. L'ensemble est ensuite agité pendant une heure. Une fois filtrés, les extraits sont lavés avec une solution de NaCl 0,58% (0,2 ml/ml de filtrat). Après avoir laissé décanter une nuit, les phases du bas (phases lipidiques) sont récupérées, séchées sur sulfate de sodium anhydre et concentrées sous vide avant d'être pesées (Folch & al., 1957). Leur composition stérolique est ensuite étudiée.

### **4.4. Analyse des stérols**

La méthode suivie est identique à celle utilisée précédemment pour l'analyse stérolique des pollens. Le standard interne se compose d'une solution éthanolique de bétuline (0,20 mg/ml) (Lognay & al., 1989).

## **5. Composition en stérols de prépupes de *Bombus terrestris* (L.) soumises à une alimentation enrichie en $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol**

### **5.1. Introduction**

L'objectif de ces méthodes est de permettre d'étudier la nature et les teneurs en stérols de prépupes de *Bombus terrestris* élevées dans des colonies nourries de pollen supplémenté en différents stérols ( $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol).

Nous avons analysé les teneurs en stérols des prépupes en fonction du régime alimentaire des colonies desquelles elles étaient issues, ceci afin de voir si la nature des stérols ajoutés à l'alimentation influence la composition stérolique des prépupes. Cette expérience devrait donc fournir des informations sur la manière dont les bourdons métabolisent les stérols.

### **5.2. Méthode d'expérimentation**

Des colonies orphelines sont formées et nourries à l'aide du régime alimentaire à tester. On y prélève six prépupes dont on ôte le tube digestif afin d'éviter que des stérols qui s'y seraient accumulés n'interfèrent avec nos résultats. On analyse ensuite la teneur en stérols des prépupes à l'aide de la méthode décrite ci-dessus (point 1.4.).

Afin de vérifier si les différences observées dans les teneurs en stérols des individus soumis aux différents régimes alimentaires sont significatives, nous avons effectué un test statistique de randomisation (Siegel, 1956).

### 5.3. Régimes alimentaires testés

Les colonies orphelines desquelles proviennent les prépupes sont nourries à l'aide de quatre régimes différents, du pollen de saule (lot C) (tableau V) ou du pollen de saule supplémenté de cholestérol, stigmastérol ou  $\beta$ -sitostérol. Les mélanges de pollen ont été broyés au pilon et supplémentés de 0,3% en poids de cholestérol (pur à 99 %, Acros-Chimica), stigmastérol (pur à 95 %, Acros-Chimica) ou  $\beta$ -sitostérol (pur à 90 %, plus 8 % de campestérol et 1 % d' $\alpha$ -sitostérol; don de la firme Caldic) selon les cas puis homogénéisés. Pour compléter ce régime, on fournit aux individus du sirop de saccharose (50% Poids/Volume) au pH ajusté à 4,7.

## **6. Nature des ecdystéroïdes (hormones de mue) mis en évidence dans les prépupes de bourdons mâles (*Bombus terrestris* (L.))**

### **6.1. Introduction**

Les méthodes mises en oeuvre dans ce chapitre doivent nous permettre d'étudier la nature et les teneurs en ecdystéroïdes des prépupes de *Bombus terrestris* élevées dans des colonies nourries de pollen supplémenté en différents stérols ( $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol).

Nous avons comparé les teneurs en ecdystéroïdes des prépupes en fonction du régime alimentaire des colonies desquelles elles sont issues.

L'étude des ecdystéroïdes a été effectuée dans le laboratoire de Biochimie, département de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure de Paris, en collaboration avec le Prof. R. Lafont et le Dr. M. Garcia.

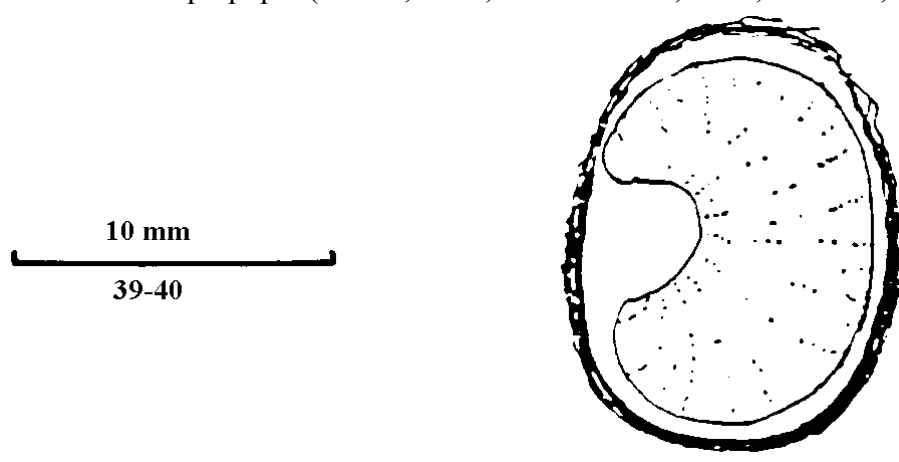
### **6.2. Mise en évidence du moment du stade prépupal correspondant à une synthèse maximale d'ecdystéroïdes**

Afin d'analyser les hormones dans des conditions quantitatives adéquates nous avons d'abord déterminé le moment du stade prépupal correspondant au taux maximum d'ecdystéroïdes. C'est à ce moment que nous devons prélever les larves afin d'analyser la nature de leurs principales hormones de mue (H.M.).

#### 6.2.1. Détermination du début du stade prépupal

Deux semaines après l'apparition des premiers pains, les oeufs se transforment en larves. Celles-ci adoptent une forme en "virgule". Elles sont isolées chacune dans une cellule de cire sphérique perforée d'un orifice de nourrissage (fig. 13).

Au cours du dernier stade larvaire, la larve s'enveloppe d'un cocon intérieur qu'elle tisse et qui finit par obstruer l'orifice "nourricier". La cellule devient alors opaque. La larve se redresse peu à peu et donne ainsi à l'ensemble une forme oblongue caractéristique. C'est le début du stade prépupal (Alford, 1975; Strambi & al., 1984; Velthuis, com. pers.).



**Figure 13.** Larve débutant le stade prépupal après avoir tissé le cocon final. D'après Alford, 1975.

#### 6.2.2. Echantillonnage des prépupes

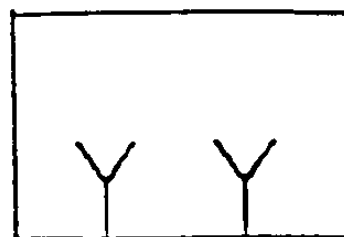
Nous avons prélevé dans les colonies orphelines une larve à 30 h., 35 h., 40 h., 45 h. et 50 h. après le début du stade prépupal.

#### 6.2.3. Dosage enzymo-immunologique (E.I.A.) des ecdystéroïdes (fig. 14)

La méthode décrite est adaptée de Porcheron & al. 1989; Royer & al., 1993, 1995; Von Gliscynski & al., 1995.

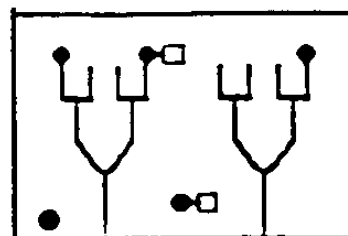
### Protocole expérimental pour l'E.I.A.

#### 1. Ig G de chèvre anti-lapin



#### 2. Réaction immunologique

- ecdystéroïde
- ◻ 20-péroxydase (traceur enzymatique)
- ┌ Ac anti-ecdystéroïde (RUD-1, AS 49-19)



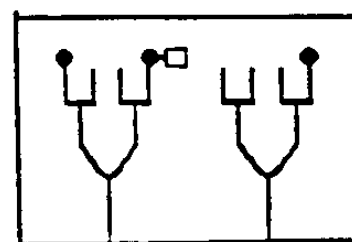
#### 3. Incubation

2h à t° ambiante  
puis une nuit à 4°C  
1h à t° ambiante.

#### 4. Lavage.

#### 5. Révélation:

réaction enzymatique avec réactif de coloration  
40-45 min. à t° ambiante.



#### 6. Lecture de l'absorption à 450 nm.

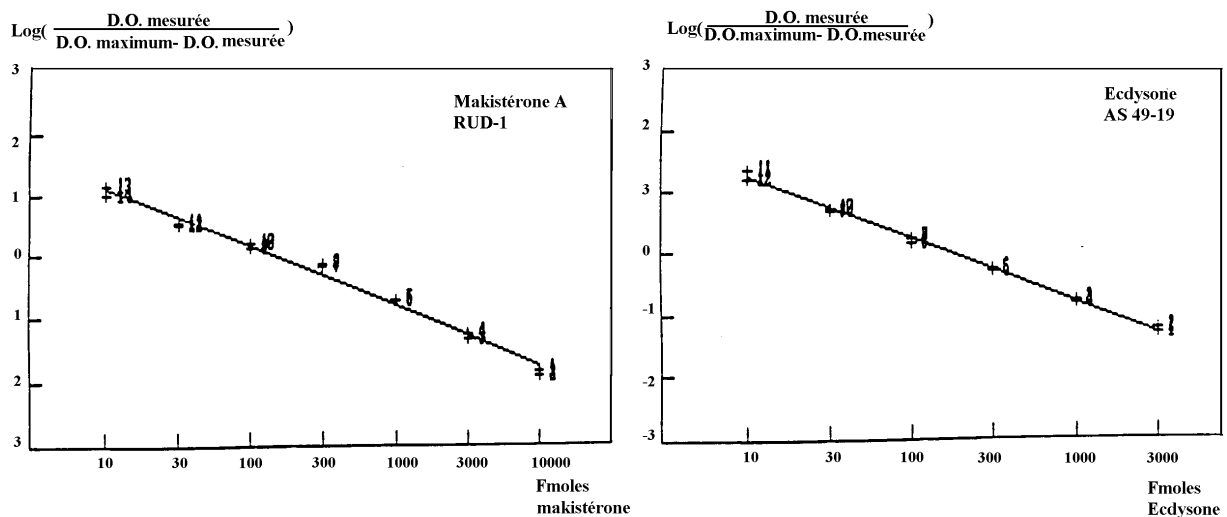
Blocage de la réaction par H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
puis lecture finale à 492 nm.

**Figure 14.** Protocole expérimental pour l'E.I.A. Les AC anti-ecdystéroïdes sont immobilisés sur la plaque par les immunoglobulines anti-IgG de lapin. Pendant l'incubation l'échantillon d'ecdystéroïdes et le traceur entrent en compétition pour les sites de liaison de l'AC anti-ecdystéroïdes. Après lavage, la plaque est révélée à l'aide d'un réactif de coloration et l'absorption est mesurée à 450 nm.



Les dosages ont été effectués à l'aide de 2 Anticorps différents, RUD-1 (Von Gliscynski & al., 1995) et AS 49-19 (Porcheron & al., 1976). Le premier est sensible à la 20-hydroxyecdysone et à la makistéron A et le second à la 20-hydroxyecdysone (avec une légère réactivité croisée à la makistéron A, mais dans ce cas l'affinité est 30 x moins importante que pour la 20-hydroxyecdysone).

Les échantillons sont broyés dans 2,5 ml de méthanol (99,9%, Acros-Chimica). Ils sont centrifugés et le surnageant, contenant les ecdystéroïdes, est prélevé. Après séchage par centrifugation sous vide (Speedvac, Savant), les échantillons sont dosés par E.I.A. (dosage enzymo-immunologique).



**Figure 15.** Courbes d'étalonnage types. Dosages E.I.A. des ecdystéroïdes standards (ecdysone et makistéron A) avec les anticorps anti-ecdystéroïdes (AS 49-19, RUD-1).

50  $\mu$ l d'échantillon, 50  $\mu$ l de traceur enzymatique (2-succinyl-20-hydroxyecdysone liée à la peroxydase) et 50  $\mu$ l d'antisérum spécifique (AS 49-19, RUD-1) sont incubés en présence de 100  $\mu$ l de tampon d'incubation (0,1 M tampon phosphate de potassium; pH 7,4; 0,4 M NaCl; 1mM EDTA; 0,1 % séralbumine bovine), d'abord 2 heures sous agitation à température ambiante puis une nuit à 4 °C et enfin 1 heure à température ambiante. Le dosage est également effectué pour des quantités connues de makistéron A et d'ecdysone afin de pouvoir établir une courbe étalon (fig. 15). Après incubation, les plaques de microtitration sont lavées au *Microplate Washer* S8/12 avec un tampon phosphate (10 mM, pH 7,4)

contenant 0,05 % de Tween-20 afin d'éliminer les anticorps non liés. Ensuite, le réactif de coloration (tampon phosphate-citrate, ortho-phénylènediamine et  $H_2O_2$ ) est distribué dans chaque puits. La lecture de la densité optique est effectuée à 40 ou 45 min. à 450 nm, ensuite, la réaction est bloquée avec 25  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  1 N et la lecture finale se fait à 492 nm.

### **6.3. Nature des hormones de mue mises en évidence dans les prépuces de bourdons mâles en fonction de leur alimentation**

#### 6.3.1. Echantillonnage

Des colonies orphelines sont formées et nourries à l'aide du régime alimentaire à tester. On y prélève 5 prépuces de bourdons mâles ( $\pm 300$  mg chacune), 40 h. après le début de leur stade préupal. On détermine ensuite la composition en ecdystéroïdes des prépuces.

#### 6.3.2. Régimes alimentaires testés

Les colonies orphelines desquelles proviennent les prépuces sont nourries de 4 régimes alimentaires différents. Il s'agit de pollen de saule (lot C) (tableaux V, VI) ou de pollen de saule supplémenté de cholestérol, de stigmastérol ou de  $\beta$ -sitostérol. Les mélanges de pollen ont été broyés au pilon et supplémentés de 0,3% en poids de cholestérol (pur à 99 %, Acros-Chimica), stigmastérol (pur à 95 %, Acros-Chimica) ou  $\beta$ -sitostérol (pur à 90 %, plus 8 % de campestérol et 1 % d' $\alpha$ -sitostérol; don de la firme Caldic) selon les cas puis homogénéisés. Pour compléter ce régime, on fournit aux individus du sirop de saccharose (50% Poids/Volume) au pH ajusté à 4,7.

### 6.3.3. Détermination de la nature des ecdystéroïdes

La méthode décrite est adaptée de Lafont & al., 1982.

Les prépuces sont broyées dans 2 ml de méthanol (99,9%) par prépuce. Elles sont centrifugées et les surnageants, contenant les ecdystéroïdes, prélevés.

Les surnageants sont évaporés, repris dans 2 x 100 µl de méthanol et regroupés par régime alimentaire. Après évaporation, les échantillons sont repris dans 200 µl de solvant H.P.L.C. (solvant: dichlorométhane-isopropanol-eau, 125:30:2). Ils sont ensuite soumis aux ultrasons, culottés puis 2 x 50 µl de chaque surnageant sont injectés sur une colonne Zorbax-sil (débit: 1,3ml/min.) pour H.P.L.C. en phase normale. 48 fractions de chaque échantillon sont collectées à la sortie de la colonne, 100 µl de chacune de ces fractions sont séchées au Speed Vac (Savant).

Les 4 x 48 fractions sont reprises avec 500 µl de tampon d'incubation puis 50 µl sont dosés par E.I.A. selon le protocole repris ci-dessus (point 6.2.3.).

## **IV. RESULTATS**

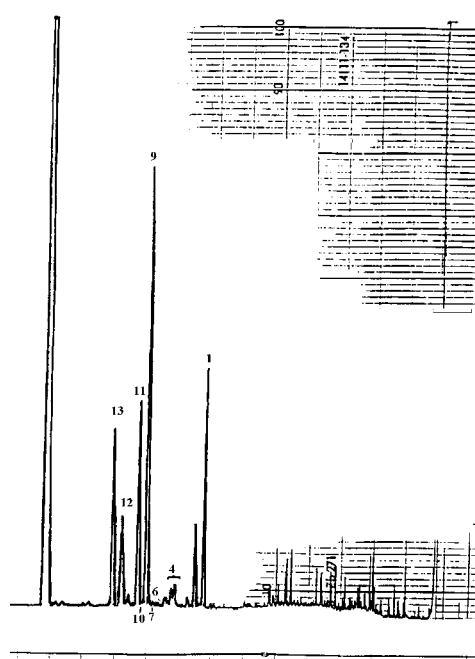
## 1. Analyses stéroliques de pollens récoltés par les bourdons, comparaison avec des pollens récoltés par les abeilles domestiques

En plus des pollens d'*Arbutus unedo* L. (arbousier), de *Salpichroa origanifolia* (Lam.) (muguet de la Pampa), de *Cerintho minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.) (mélinet), d'*Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach) (aconit tue-loup) et de *Solanum lycopersicum* Dombito (tomate) récoltés préférentiellement ou exclusivement par les bourdons, nous avons analysé à titre de comparaison deux autres pollens: le pollen de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* (Moench) Delile) et le pollen de tournesol (*Helianthus annuus* L.). La composition en stérols de plusieurs autres pollens récoltés par *Apis mellifera* est par ailleurs décrite dans la littérature (Simal & al., 1988) (tableau III).

### 1.1. Pollen d'*Arbutus unedo* L.

*Arbutus unedo* L. était l'unique arbre en fleur butiné par *Bombus terrestris* dans le massif des Maures au début du mois de décembre. Nous avons recueilli 70,2 mg de pollen en 2 jours de récolte. La teneur en stérols totaux du pollen d'arbousier est de 3,88 mg/g de matière fraîche (M.F.).

Les stérols les plus représentés dans le pollen d'arbousier sont des stérols à 29 carbones. Soit principalement le  $\beta$ -sitostérol (35,42 %) (pic 9), le  $\Delta^5$ -avénastérol (16,16 %) (pic 11), le  $\Delta^7$ -avénastérol (15,80 %) (pic 13) et le  $\Delta^7$ -stigmastérol (7,89 %) (pic 12). Le cholestérol (12,50 %) (pic 1) y est abondant et les stérols à 28 carbones sont présents en très faibles quantités (fig. 16).

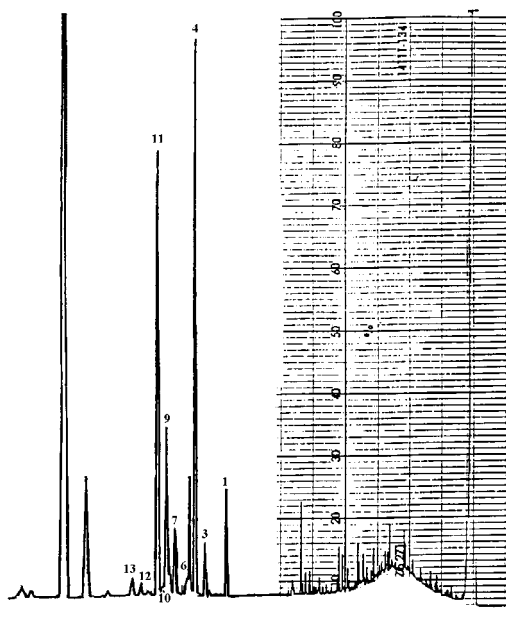


**Figure 16.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen d'arbousier. Le cholestérol correspond au pic 1, l'ensemble campestérol/24 méthylènecholestérol au pic 4, le stigmastérol au pic 6, le  $\Delta^7$ -campestérol au pic 7, le  $\beta$ -sitostérol au pic 9, le stigmastanol au pic 10, le  $\Delta^5$ -avénastérol au pic 11, le  $\Delta^7$ -stigmastérol au pic 12 et le  $\Delta^7$ -avénastérol au pic 13.

## 1.2. Pollen de *Salpichroa organifolia* (Lam.)

*Salpichroa organifolia* (Lam.) était une des seules plantes en fleurs butinée par *Bombus terrestris* à Hyères au début du mois de décembre 1992. Nous avons recueilli 88 mg de pollen (3 jours de récolte). La teneur en stérols totaux du pollen de *Salpichroa organifolia* (Lam.) est de 6,43 mg/g de matière fraîche (M.F.).

Ce pollen est très riche en stérols totaux, plus de 0,6 % alors que les teneurs habituelles se situent entre 0,3 et 0,4 % (Stanley & Linskens, 1974). La fraction campestérol/24 méthylènecholestérol (28,65 %) (pic 4) y est la plus abondante. Les stérols à 29 carbones constituent la quasi-totalité des autres stérols avec en particulier le  $\Delta^5$ -avénastérol (27,26 %) (pic 11) et le  $\beta$ -sitostérol (9,77 %) (pic 9). Enfin, nous avons identifié du cholestérol (4,37 %) (pic 1) (fig. 17).



**Figure 17.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen de *salpichroa*. Le cholestérol est représenté par le pic 1, le brassicastérol par le pic 3, l'ensemble campestérol/24 méthylènecholestérol par le pic 4, le stigmastérol par le pic 6, le  $\Delta 7$ -campestérol par le pic 7, le  $\beta$ -sitostérol par le pic 9, le stigmastanol par le pic 10, le  $\Delta 5$ -avénastérol par le pic 11, le  $\Delta 7$ -stigmastérol par le pic 12 et le  $\Delta 7$ -avénastérol par le pic 13.

### 1.3. Pollen de *Solanum lycopersicum* Dombito

Le pollen de *Solanum lycopersicum* Dombito analysé provient d'un don du Professeur F.J. Jacob (Universiteit Gent). L'analyse présentée ci-dessous est préliminaire et le profil stérolique n'est pas illustré. La teneur en stérols totaux du pollen de tomate est de 1,59 mg/g de matière fraîche (M.F.).

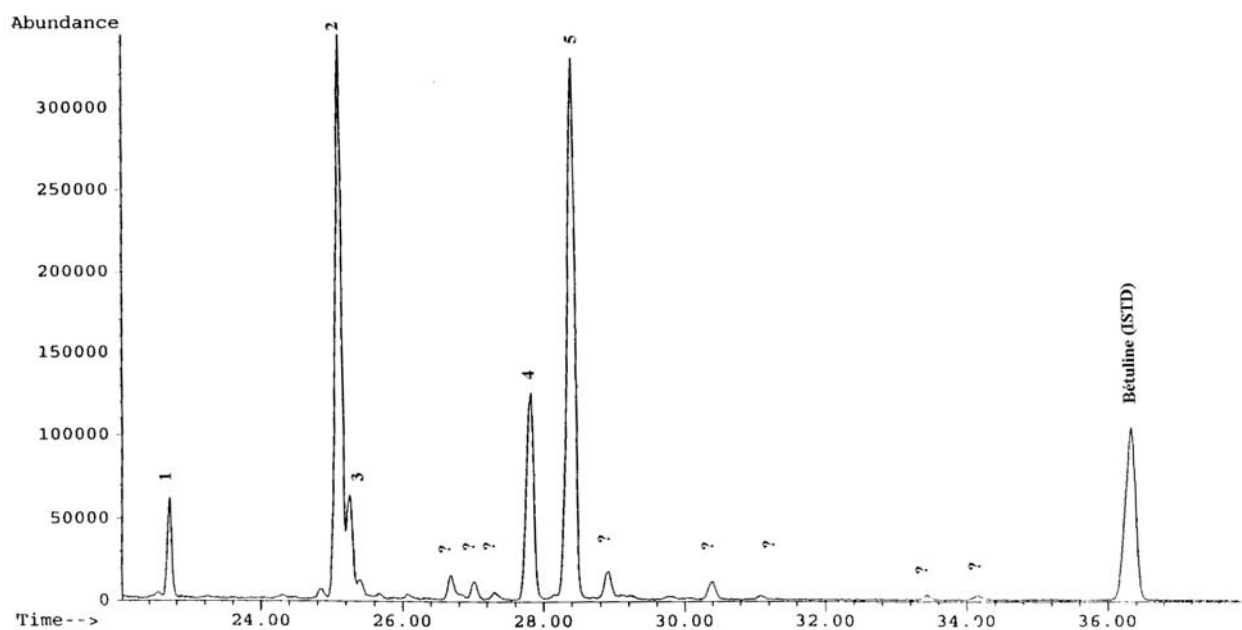
Les stérols les plus représentés sont des stérols à 29 carbones en particulier le  $\Delta 5$ -avénastérol (42,9 %), le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol qui représentent 9,2 % des stérols totaux. Le taux de cholestérol est de 4,5 % et celui de l'ensemble campestérol/24 méthylènecholestérol de 16,8 %. Dans cette analyse, le pourcentage de composés non identifiés est important (18,21 %).

#### 1.4. Pollen de *Cerithe minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.)

Les récoltes ont été effectuées pendant le mois de juillet 1993. Nous avons recueilli 34,3 mg de pollen.

*Cerithe minor* L. subsp. *auriculata* (Ten.) n'était pas l'unique plante à bourdons en fleur au moment de la récolte. Ce pollen ne devrait donc pas être monofloral. Les quantités de pollen récoltées étaient trop faibles pour que nous puissions en analyser la composition pollinique. Cependant, d'après nos observations, seuls *Bombus* (*Pyrobombus*) *brodmannicus delmasi* (Tkalcu), *B.* (*Rhodobombus*) *mesomelas* Gerstaecker, *B.* (*Pyrobombus*) *pratorum* (L.) et *B.* (*Thoracobombus*) *runderarius* (Müller) et *Osmia cerinthidis* Morawitz (Hymenoptera, Megachilidae) butinaient la cérinthe. *Apis mellifera* ne la butinait pas. La teneur en stérols totaux du pollen de mélinet est de 22,20 mg/g de matière fraîche (M.F.).

Les stérols à 29 carbones sont les plus abondants, le  $\beta$ -sitostérol (pic 4) et le  $\Delta^5$ -avénastérol (pic 5) représentent respectivement 13,95 % et 37,38 % des stérols totaux. Le taux de 24 méthylènecholestérol est de 30,92 % (pic 2). Le pourcentage des composés non identifiés est de 4,76 % des stérols totaux (fig.18).



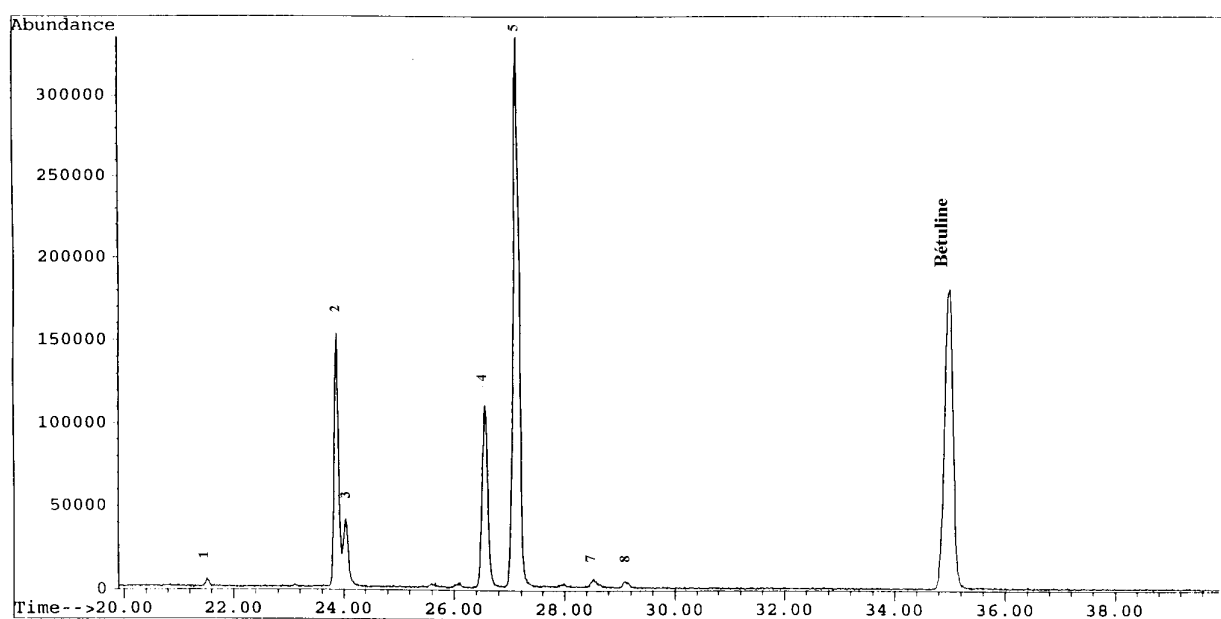


**Figure 18.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen de mélinet. Le cholestérol est désigné par le pic 1, le 24 méthylènecholestérol par le pic 2, le campestérol par le pic 3, le  $\beta$ -sitostérol par le pic 4 et le  $\Delta^5$ -avénastérol par le pic 5.

### 1.5. Pollen d'*Aconitum lycoctonum* L. subsp. *vulparia* (Reichenbach)

Les récoltes ont été effectuées pendant le mois d'août 1993. 216,4 mg de pollen ont été recueillis. L'aconit tue-loup était l'unique plante visitée par *Bombus hortorum hortorum* (L.), *Bombus (Megabombus) gerstaeckeri* Morawitz et *Bombus wurfleini pyrenaicus* Vogt à l'endroit de la récolte; le pollen analysé devrait donc être monofloral (Rasmont, com. pers.). La teneur en stérols totaux du pollen d'aconit tue-loup est de 2,84 mg/g de matière fraîche (M.F.).

Le pollen de l'aconit tue-loup est très riche en stérols à 29 carbones qui représentent à eux seuls plus de 70 % des stérols totaux. Le pollen est composé presque uniquement de trois stérols: le  $\beta$ -sitostérol (17,47 %) (pic 4) et le  $\Delta^5$ -avénastérol (54,84 %) (pic 5), stérols à 29 carbones, ainsi que 19,19 % de 24 méthylènecholestérol (pic 2) (fig. 19).



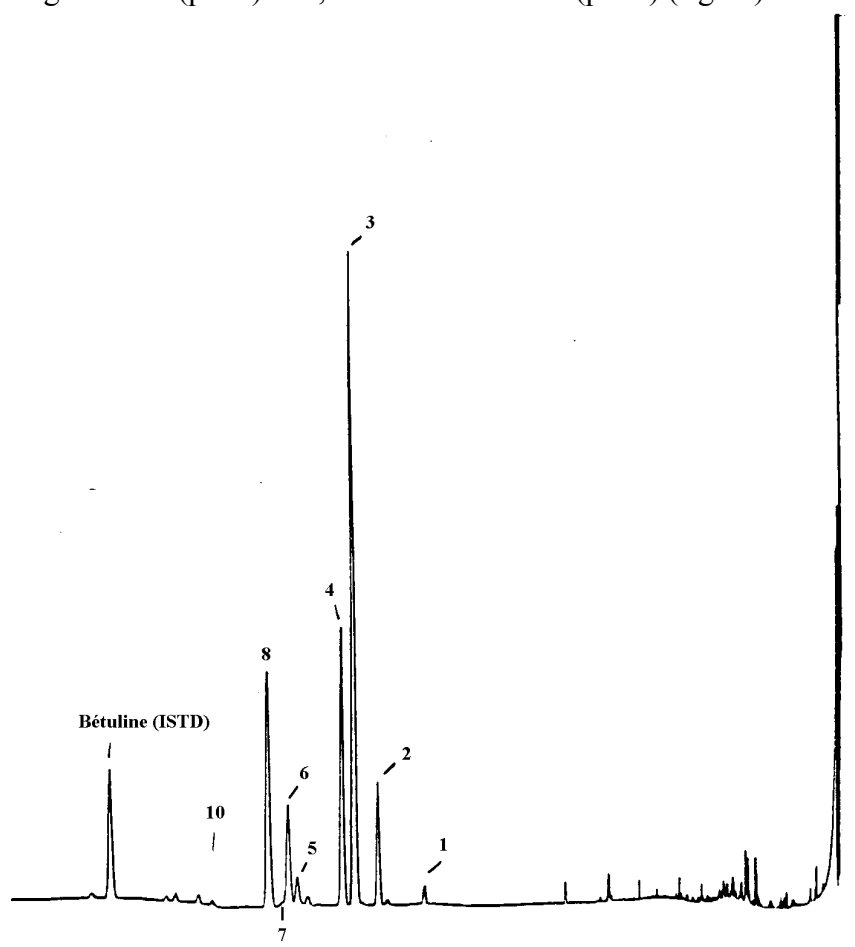
**Figure 19.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen d'aconit. Le cholestérol correspond au pic 1, le 24 méthylènecholestérol au pic 2, le campestérol au pic 3,

le  $\beta$ -sitostérol au pic 4, le  $\Delta^5$ -avénastérol au pic 5, le  $\Delta^7$ -stigmastérol au pic 7 et le  $\Delta^7$ -avénastérol au pic 8.

### 1.6. Pollen de *Brassica napus* L. var. *oleifera* (Moench) Delile

Le pollen analysé est le résultat du tri manuel d'un échantillon du pollen récolté par les abeilles domestiques. Sa composition floristique est la suivante: 95,3 % de Brassicacées, 3,5 % de Fabacées et 1,2 % de Salicacées. La teneur en stérols totaux du pollen de colza est de 3,39 mg/g de matière fraîche (M.F.).

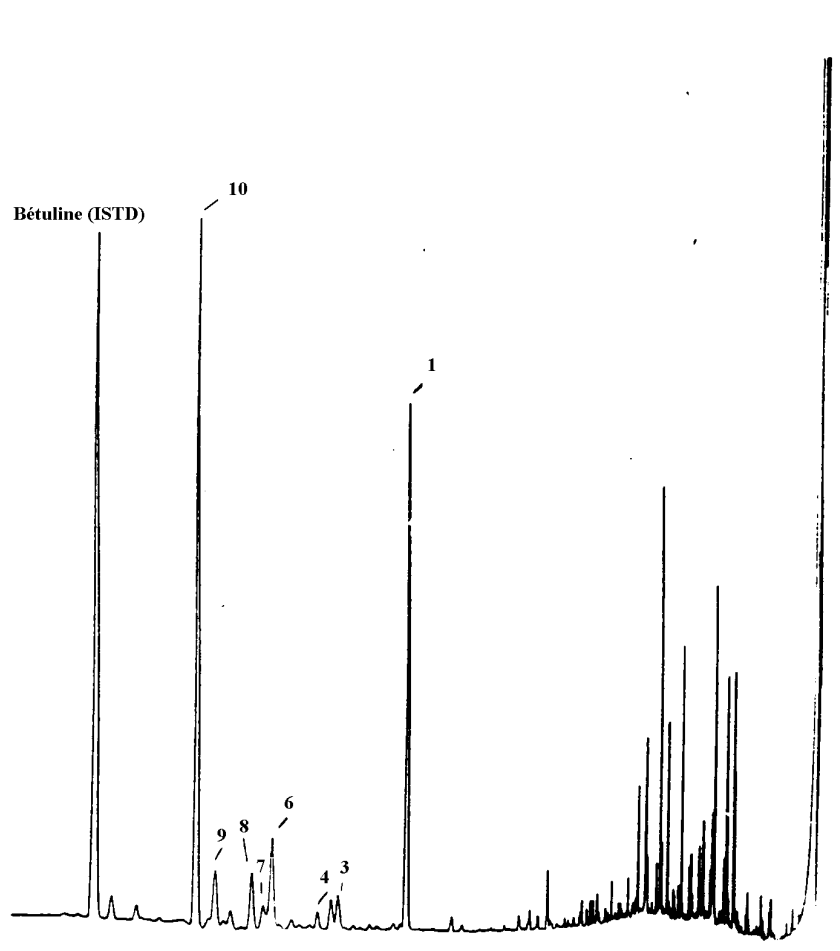
La fraction campestérol/24 méthylènecholestérol (pic 3) est très abondante dans le pollen de colza, elle constitue 41,75 % des stérols totaux. Les stérols à 29 carbones sont également très présents. Ainsi, on trouve 19,21 % de  $\Delta^5$ -avénastérol (pic 8), 17,99 % de stigmastérol (pic 4) et 7,8 % de  $\beta$ -sitostérol (pic 6) (fig.20).



**Figure 20.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen de colza. Le cholestérol correspond au pic 1, le brassicastérol au pic 2, l'ensemble campestérol/24 méthylènecholestérol au pic 3, le stigmastérol au pic 4, le  $\Delta^7$ -campestérol au pic 5, le  $\beta$ -sitostérol au pic 6, le stigmastanol au pic 7, le  $\Delta^5$ -avénastérol au pic 8 et le  $\Delta^7$ -avénastérol au pic 10.

### 1.7. Pollen d'*Helianthus annuus* L.

Le pollen analysé est le résultat du tri manuel d'un échantillon du pollen récolté par les abeilles domestiques. Sa composition floristique est la suivante: 91,2 % de *Helianthus annuus* et de 8,8 % de *Taraxacum* sp. La teneur en stérols totaux du pollen de tournesol est de 0,58 mg/g de matière fraîche (M.F.).



**Figure 21.** Chromatogramme des stérols identifiés dans le pollen de tournesol. Le cholestérol est représenté par le pic 1, l'ensemble campestérol/24 méthylènecholestérol par le pic 3, le stigmastérol par le pic 4, le  $\beta$ -sitostérol par le pic 6, le stigmastanol par le

pic 7, le  $\Delta 5$ -avénastérol par le pic 8, le  $\Delta 7$ -stigmastérol par le pic 9 et le  $\Delta 7$ -avénastérol par le pic 10.

Le pollen de tournesol est un pollen très riche en cholestérol (27,17 %) (pic 1). Le stérol le plus abondant est le  $\Delta 7$ -avénastérol (pic 10). Il représente 43,99 % des stérols totaux. Les autres constituants à 29 carbones sont le  $\beta$ -sitostérol (7,48 %) (pic 6), le  $\Delta 7$ -stigmastérol (5,8 %) (pic 9) et le  $\Delta 5$ -avénastérol (4,77 %) (pic 8) (fig. 21).

### 1.8. Tableau récapitulatif de la composition stérolique des pollens analysés

**Tableau IV. Composition stérolique des pollens analysés.** Les résultats sont exprimés en % des stérols totaux. En gras, les trois stérols les plus représentés. Inconnu= substance non identifiée. (MF: matière fraîche, N.D.: non détecté; Camp. + 24 Méth.Chol: campestérol +24-Méthylènecholestérol).

Composition stérolique des pollens (% des stérols totaux)							
Stérols	<i>Salpichroa origanifolia (Lam.)</i>	<i>Arbutus unedo L.</i>	<i>Solanum lycopersicum Dombito</i>	<i>Cerithe minor L.</i>	<i>Aconitum lycoctonum L.</i>	<i>Brassica napus L.</i>	<i>Helianthus annuus L.</i>
Cholestérol	4,37	12,50	4,5	4,31	0,42	0,91	<b>27,17</b>
Brassicastérol	2,49	N.D.	N.D.	0,55	N.D.	7,04	N.D.
Camp.+ 24 Méth. Chol.	<b>28,65</b>	2,29	<b>16,8</b>	<b>36,59</b>	<b>25,13</b>	<b>41,75</b>	1,32
Stigmastérol	0,82	0,79	4,70	N.D.	N.D.	<b>17,99</b>	1,23
$\Delta 7$ -Campestérol	3,77	0,28	N.D.	N.D.	N.D.	2,2	N.D.
$\beta$ -Sitostérol	<b>9,77</b>	<b>35,42</b>	4,5	<b>13,95</b>	<b>17,47</b>	7,8	<b>7,48</b>
Stigmastanol	0,39	0,34	6,40	N.D.	N.D.	0,51	1,83
$\Delta 5$ -Avénastérol	<b>27,26</b>	<b>16,16</b>	<b>42,90</b>	<b>37,38</b>	<b>54,84</b>	<b>19,21</b>	4,77
$\Delta 7$ -Stigmastérol	0,77	7,89	0,4	N.D.	0,92	N.D.	5,80
$\Delta 7$ -Avénastérol	1,21	<b>15,80</b>	N.D.	N.D.	0,67	0,33	<b>43,99</b>
Inconnus	20,50	6,35	<b>18,21</b>	4,76	0,55	2,26	6,41

Teneurs en stérols totaux (mg/g MF)	6,43 mg/g MF	3,88 mg/g MF	1,59 mg/g MF	22,20 mg/g MF	2,84 mg/g MF	3,39 mg/g MF	0,58 mg/g MF
-------------------------------------	--------------	--------------	--------------	---------------	--------------	--------------	--------------

## 2. Test sur la qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, du cholestérol et du stigmastérol

### 2.1. Composition floristique et stérolique des mélanges de pollens utilisés comme base alimentaire au cours des expériences

Trois mélanges différents de pollens nous ont servi de bases alimentaires. L'analyse floristique (tableau V) ainsi que la détermination des stérols contenus dans ces mélanges (tableau VI) ont été réalisés.

**Tableau V. Composition floristique des trois mélanges de pollens utilisés comme bases alimentaires.**

Composition floristique des pollens du lot A, B et C		
Lot A	Lot B	Lot C
65% Brassicacées	37,6% Astéracées	81,7 % Salicacées
14% Renonculacées	26,5% Poacées	14,7 % fruitiers
12,3% Rosacées	16,3% <i>Taraxacum</i>	2,4 % <i>Fragaria</i>
4% Fabacées	13,7% Brassicacées	1,2 % <i>Taraxacum</i>
2,2% <i>Eucalyptus</i>	3,4% Rosacées	
1,5% Cistacées	2,5% Fabacées	
autres 1%		

**Tableau VI. Pourcentages et teneurs en stérols des mélanges de pollen utilisés comme base alimentaire** (analyses détaillées aux annexes VII et VIII). (MF: matière fraîche; MS: matière sèche; N: azote total; N.D.: non détecté). En gras, stérols majoritaires. (\*) Identification réalisée sur base des travaux de Takatsuto & Omote (1989a, 1989b).

Composition stérolique des pollens du lot A, B et C						
Stérols	mg stérol/g	% en	mg stérol/g	% en	mg stérol/g	% en
	lot B en MF	stérols du lot B (tournesol)	lot A en MF	stérols du lot A (colza)	lot C en MF	stérols du lot C (saule)
Cholestérol	1,12	<b>22,40</b>	0,22	2,67	0,02	0,56
Brassicastérol	0,20	4	0,92	<b>11,17</b>	N.D.	N.D.
Camp.+ 24 Méth. Chol.	1,13	<b>22,60</b>	4,34	<b>52,69</b>	2,88	<b>65,02</b>
Stigmastérol	0,07	1,45	0,37	4,50	N.D.	N.D.
$\Delta$ 7-Campestérol	0,07	1,43	0,26	3,16	N.D.	N.D.
$\beta$ -Sitostérol	0,82	<b>16,40</b>	0,34	4,13	0,52	<b>11,82</b>
Stigmastanol	0,12	2,41	0,18	2,19	N.D.	N.D.
$\Delta$ 5-Avénaatérol	0,10	2,12	0,70	<b>8,50</b>	0,39	<b>8,08</b>
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,25	5	0,007	0,08	0,03	0,62
23-déhydrocampestanol(*)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,06	1,23
23-déhydrocholestanol(*)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,04	0,75
$\Delta$ 7-Avénaatérol	0,11	2,20	N.D.	N.D.	0,08	1,99
Inconnu	0,97	19,40	0,81	9,78.	0,31	7,15
Teneurs en stérols totaux (mg/g)	5,00 MF 7,17 MS		8,24 MF 11,13 MS		4,44 MF 6,49 MS	
Pourcentages en protéines (M.S.)	14%		21%		27%	

Ces trois mélanges présentent des profils stéroliques différents (tableau VI) avec en particulier, une plus grande quantité de  $\beta$ -sitostérol et de cholestérol dans le mélange riche en tournesol (lot B) (0,82 mg/g et 1,12 mg/g de matière fraîche) que dans le mélange riche en

colza (lot A) (0,34 mg/g et 0,22 mg/g de matière fraîche). Notons également la faible quantité de cholestérol et la teneur élevée en 24-méthylènecholestérol dans les pollens du lot A et du lot C. Ces caractéristiques sont importantes et ont influencé le choix de l'aliment contrôlé utilisé pour chaque type de supplémentation. Ainsi, par exemple, un mélange pauvre en cholestérol peut être employé comme base pour l'étude des effets liés à une supplémentation en cholestérol.

Lors des supplémentations en stérol, on a pris soin de vérifier l'homogénéité des mélanges obtenus.

## **2.2. Test sur la qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol**

Le détail des résultats chiffrés correspondant au suivi journalier de chaque colonie orpheline ainsi que les analyses statistiques se trouvent aux annexes I et XV.

L'influence de la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol a été évaluée sur les paramètres biologiques suivants: le nombre de bourdons mâles, leur durée de vie, la longueur radiale de leur aile antérieure, la durée de la période précédant l'apparition du premier cocon et l'émergence des mâles.

Le tableau qui suit est une synthèse des résultats.





**Tableau VII. Tableau récapitulatif de la durée de vie, la longueur radiale des ailes antérieures droites, la durée de la période précédant l'émergence, la durée de la période précédant la formation du premier cocon et le nombre de bourdons mâles émergés en 100 jours dans chaque colonie orpheline nourrie de pollen de colza (lot A) supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol, ou de pollen de tournesol (lot B) supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol. (colza +  $\beta$ -sito.: colza +  $\beta$ -sitostérol; tournesol +  $\beta$ -sito.: tournesol +  $\beta$ -sitostérol; moy.: moyenne).**

blocs	Pollen et supplémentation	Durée de vie (j)			Longueur radiale (mm)			Durée de la période précédant l'émergence (j)			Mâles/100j. Total	1 <sup>er</sup> cocon (jours)
		Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type		
Bloc 1	Colza	27	35,8	13,4	27	3,7	0,2	32	58,1	13,7	32	28
	Colza + $\beta$ -sito.	36	41,3	14,5	23	3,6	0,2	34	51	13,4	36	28
	Tournesol	9	24,2	7,6	9	3,5	0,2	11	76,2	5,7	11	58
	Tournesol + $\beta$ -sito.	12	17	10,2	10	3,5	0,3	13	77,6	6,3	13	38
Bloc 2	Colza	33	34,1	14,1	28	3,6	0,3	40	48,8	12,2	40	25
	Colza + $\beta$ -sito.	23	33,2	14,4	22	3,6	0,4	24	49,3	13,0	24	26
	Tournesol	24	28,2	12,1	23	3,4	0,2	29	66,9	17,4	32	28
	Tournesol + $\beta$ -sito.	9	26,2	7,5	8	3,3	0,3	10	75,2	13,3	10	47
Bloc 3	Colza	21	37,4	11,3	19	4	0,2	22	47,7	12,4	22	22
	Colza + $\beta$ -sito.	29	31,2	11,6	32	3,7	0,3	34	57	20,2	34	22
	Tournesol	28	30,7	11,9	24	3,4	0,4	32	49,7	10,6	32	23
	Tournesol + $\beta$ -sito.	22	29,9	9,4	20	3,5	0,2	26	54,0	8,6	28	22
Bloc 4	Colza	34	38,6	15,7	31	3,6	0,3	43	56,6	18,4	45	28
	Colza + $\beta$ -sito.	15	33,8	6,7	12	3,7	0,4	18	53,7	11,4	18	28
	Tournesol	18	32,1	9,0	17	3,5	0,2	23	66,1	18,2	23	34
	Tournesol + $\beta$ -sito.	31	25,4	11,8	27	3,3	0,4	31	56	12,7	31	31
<b>Moy.</b>	Colza		36,5	14,2		3,7	0,3		52,8	15,5	34,8 ± 8,7	25,8 ± 2,0
	Colza + $\beta$ -sito.		34,9	13,6		3,7	0,3		52,8	2	28 ± 7	26,0 ± 2,4
	Tournesol		28,8	11,3		3,5	0,3		64,7	17,4	24,3 ± 8,4	35,8 ± 1,0
	Tournesol + $\beta$ -sito.		24,6	11,3		3,4	0,3		65,7	9	20,5 ± 9,1	34,5 ± 9,0

### 1. Durée de vie des mâles

La nature du pollen a eu une influence hautement significative ( $\alpha=0,001$ ) sur la durée de vie des mâles. C'est avec les mélanges à base de pollen de colza (lot A) que les durées de vie les plus longues ont été observées, soit  $36,5 \pm 14,2$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type) et  $34,9 \pm 13,6$  jours contre  $28,8 \pm 11,3$  jours et  $24,6 \pm 11,3$  jours dans les colonies nourries avec les mélanges à base de pollen de tournesol (tableau VII). Nous pouvons également conclure à des interactions très significatives entre pollens et colonies ( $\alpha=0,01$ ). Par contre, il n'y a pas de différences significatives entre les colonies orphelines. La supplémentation en  $\beta$ -sitostérol est sans effet sur la durée de vie des bourdons mâles.

### 2. Taille des bourdons mâles

La nature du pollen a une influence hautement significative ( $\alpha=0,001$ ) sur la taille des bourdons (estimée sur base de la longueur radiale des ailes antérieures). Les bourdons mâles sont plus grands s'ils ont été élevés dans les colonies orphelines nourries à l'aide des mélanges à base de pollen de colza (lot A), soit  $3,7 \pm 0,3$  mm (moyenne  $\pm$  écart-type) et  $3,7 \pm 0,3$  mm contre  $3,5 \pm 0,3$  mm et  $3,4 \pm 0,3$  mm dans les colonies nourries avec les mélanges riches en pollen de tournesol (tableau VII). Nous avons également observé des différences hautement significatives ( $\alpha=0,001$ ) entre les colonies orphelines (blocs). Chaque colonie est en effet composée d'un très petit nombre d'ouvrières (5) et les idiosyncrasies sont importantes. Nous ne mettons pas en évidence de différence liée à la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol. Enfin, on constate une interaction significative entre colonies orphelines (blocs) et pollens.

### 3. Durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles

Pour la période précédant l'émergence des bourdons mâles, nous observons des différences hautement significatives en fonction du type de pollen ( $\alpha=0,001$ ). Les bourdons

mâles ont d'abord émergé dans les colonies orphelines nourries du mélange à base de pollen de colza (lot A), soit après  $52,8 \pm 15,5$  jours et  $52,8 \pm 2$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type) contre  $64,70 \pm 17,44$  jours et  $65,7 \pm 9$  jours dans les colonies nourries avec le pollen de tournesol (tableau VII). Il existe également des différences hautement significatives ( $\alpha=0,001$ ) entre les blocs (colonies). Nous n'avons pas mis en évidence de différences liées à la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol.

#### 4. Nombre de bourdons mâles émergés en 100 jours

Le nombre de bourdons mâles émergés en 100 jours est très significativement plus grand ( $\alpha=0,01$ ) lorsque leurs génitrices ont été nourries avec les mélanges de pollen non supplémentés en  $\beta$ -sitostérol, soit de  $34,8 \pm 8,7$  et  $24,3 \pm 8,4$  mâles pour les mélanges riches en pollen de colza (lot A) et de tournesol (lot B) contre  $28 \pm 7$  et  $20,5 \pm 9,1$  mâles dans les colonies nourries avec le pollen de colza et de tournesol supplémentés en  $\beta$ -sitostérol. Nous avons également observé une différence très significative ( $\alpha=0,01$ ) entre les deux types de pollens. Le nombre de bourdons est plus grand dans les colonies alimentées au mélange de pollens à base de colza, soit de  $34,8 \pm 8,7$  individus contre  $24,3 \pm 8,4$  dans les colonies nourries avec le pollen de tournesol (tableau VII).

#### 5. Durée de la période précédant l'apparition des premiers cocons

D'après le test khi-carré, nous avons conclu, pour la date d'apparition du premier cocon, à l'absence de différence significative entre les quatre types de régimes alimentaires (tableau VII).

### **2.3. Test sur la qualité nutritionnelle du cholestérol**

Le détail des données chiffrées et des analyses statistiques est fourni aux annexes II et XVI. Le tableau suivant est une synthèse des résultats.

L'influence de la supplémentation en cholestérol a été évaluée sur les paramètres biologiques suivants: le nombre de bourdons mâles, leur durée de vie, la longueur radiale de leur aile antérieure, la durée de la période précédant l'apparition du premier cocon et l'émergence des mâles.

Le pollen de saule (lot C) a été choisi comme aliment de base pour sa faible teneur en cholestérol.

Le tableau qui suit est une synthèse des résultats.

**Tableau VIII. Tableau récapitulatif de la durée de vie, la longueur radiale des ailes antérieures droites, la durée de la période précédant l'émergence, la durée de la période précédant la formation du premier cocon et le nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours dans chaque colonie orpheline nourrie de pollen de saule (lot C) supplémenté ou non en cholestérol. (Moy.: moyenne)**

blocs	Pollen et supplémentation	Durée de vie (j)			Longueur radiale (mm)			Durée de la période précédant l'émergence (j)			Mâles/65 j. Total	1 <sup>er</sup> cocon (Jours)
		Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type		
Bloc 1	Saule	13	34,8	10,1	13	3,8	0,4	16	40,2	10,5	16	22
	Saule + cholestérol	5	30,6	2,2	5	3,8	0,2	5	42,2	1,8	5	31
Bloc 2	Saule	19	35,9	8,0	20	3,9	0,4	20	38,3	3,8	20	25
	Saule + cholestérol	9	26,4	9,1	8	4,0	0,2	11	44,3	14,6	11	25
Bloc 3	Saule	9	25,1	8,4	9	4	0,1	11	34,6	1,4	11	23
	Saule + cholestérol	3	14,7	4,2	3	3,9	0,5	3	40,3	5,8	3	23
Bloc 4	Saule	9	20,7	10,9	8	4,1	0,4	9	47	11,8	9	25
	Saule + cholestérol	2	39,5	2,1	2	4,2	0,4	3	39,3	0,6	3	25
Bloc 5	Saule	8	35,4	5,5	8	3,8	0,2	8	34,4	3,9	8	23
	Saule + cholestérol	5	27	7,5	5	4,1	0,1	5	35,2	3,5	5	23
Bloc 6	Saule	5	22	4,7	5	4	0,2	7	33,6	3,7	7	22
	Saule + cholestérol	1	16		1	4,1		3	33	1,7	3	22
<b>Moy.</b>	Saule		29	10		3,9	0,3		38,0	7,9	11,8 ± 4,5	23,3 ± 1,2
	Saule + cholestérol		25,7	8,9		4,0	0,2		39,1	10,2	5,0 ± 2,8	24,8 ± 3,0

### 1. Durée de vie des mâles

L'ajout de cholestérol a eu une influence très significative ( $\alpha=0,01$ ) sur la durée de vie des mâles. C'est avec le mélange à base de pollen de saule (lot C) supplémenté en cholestérol que les durées de vie les plus courtes ont été observées, soit  $25,7 \pm 8,9$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type) contre  $29 \pm 10$  jours avec le pollen de saule (tableau VIII). Nous pouvons également conclure à des différences hautement significatives entre les colonies orphelines ( $\alpha=0,001$ ) et à une interaction significative entre alimentation et colonies orphelines.

### 2. Taille des bourdons mâles

La supplémentation n'a pas d'influence significative ( $\alpha= 0,05$ ) sur la taille des bourdons (estimée sur base de la longueur radiale des ailes antérieures). Soit  $3,9 \pm 0,3$  mm (moyenne  $\pm$  écart-type) pour le pollen de saule (lot C) contre  $4,0 \pm 0,2$  mm s'il est enrichi de cholestérol (tableau VIII). Nous n'avons pas non plus observé de différences significatives entre les colonies orphelines (blocs) ni d'interaction entre ces dernières (blocs) et l'alimentation.

### 3. Durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles

D'après l'analyse de la variance, il n'y a pas de différence significative entre les deux types de régimes alimentaires. Les bourdons mâles ont émergé en même temps dans les colonies orphelines nourries du mélange à base de pollen de saule (lot C), soit après  $38,0 \pm 7,9$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type), que dans les colonies nourries avec le pollen de saule + cholestérol, soit après  $39,1 \pm 10,2$  jours (tableau VIII). Par contre, nous avons observé des différences très significatives ( $\alpha= 0,01$ ) (tableau VIII) entre les colonies orphelines. Ainsi qu'une interaction significative entre ces dernières (blocs) et l'alimentation.

#### 4. Nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours

Le nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours est très significativement plus grand ( $\alpha=0,01$ ) lorsque leurs génitrices ont été nourries avec le mélange à base de pollen de saule (lot C) non supplémenté en cholestérol, soit de  $11,8 \pm 4,5$  contre  $5,0 \pm 2,8$  pour le mélange enrichi (tableau VIII).

#### 5. Durée de la période précédant l'apparition des premiers cocons

D'après le test khi-carré nous avons conclu à l'absence de différence significative entre les deux types de régimes alimentaires. Le premier cocon est apparu après  $23,3 \pm 1,2$  jours dans les colonies orphelines nourries du mélange à base de pollen de saule (lot C) et après  $24,8 \pm 3,0$  jours dans les colonies nourries avec le pollen de saule + cholestérol (tableau VIII).

### **2.4. Test sur la qualité nutritionnelle du stigmastérol**

Le détail des données chiffrées et des analyses statistiques est fourni aux annexes III et XVII. Le tableau suivant est une synthèse des résultats.

L'influence de la supplémentation en stigmastérol a été évaluée sur les paramètres biologiques suivants: le nombre de bourdons mâles, leur durée de vie, la longueur radiale de leur aile antérieure, la durée de la période précédant l'apparition du premier cocon et l'émergence des mâles.

Le pollen de saule (lot C) a été choisi comme aliment de base car il ne contient pas de stigmastérol.

Le tableau qui suit est une synthèse des résultats.



**Tableau IX. Tableau récapitulatif de la durée de vie, la longueur radiale des ailes antérieures droites, la durée de la période précédant l'émergence, la durée de la période précédant la formation du premier cocon et le nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours dans chaque colonie orpheline nourrie de pollen de saule (lot C) supplémenté ou non en stigmastérol.**

blocs	Pollen et supplémentation	Durée de vie (j)			Longueur radiale (mm)			Durée de la période précédant l'émergence (j)			Mâles/65 j.	1 <sup>er</sup> cocon (j)
		Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Répétitions	Moyenne	Ecart-type	Total	(Jours)
Bloc 1	Saule	17	30,4	9,5	17	2,8	1,2	18	50,1	8,2	18	26
	Saule+stigmastérol	10	37,1	12,0	10	2,6	1,1	11	49	2,8	11	22
Bloc 2	Saule	13	35,9	11,0	13	2,6	1,2	12	54,3	7,9	12	26
	Saule+stigmastérol	9	33,9	10	9	3,3	1,7	9	47,8	11,4	9	24
Bloc 3	Saule	7	33,0	13,0	6	2,7	1,2	8	43,5	12,2	8	20
	Saule+stigmastérol	4	45,5	16,8	4	4,9	1,8	4	21,8	4,5	4	24
<b>Moy.</b>	Saule		33,1	10,7		2,7	1,2		49,3	9,6	12,7 ± 4,1	24 ± 2,8
	Saule+stigmastérol		38,8	12,2		3,6	1,6		39,5	6,2	8 ± 2,9	23,3 ± 0,9



### 1. Durée de vie des mâles

Le stigmastérol n'a pas influencé la durée de vie des bourdons mâles. Celle-ci est en moyenne statistiquement identique dans les colonies nourries au pollen de saule (lot C) supplémenté, soit  $33,1 \pm 10,7$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type) que dans les colonies alimentées avec le pollen enrichi en stigmastérol soit  $38,8 \pm 12,2$  jours (tableau IX). Nous ne pouvons pas non plus conclure à des différences significatives entre les colonies orphelines. En revanche, il y a une interaction significative entre alimentation et colonies orphelines.

### 2. Taille des bourdons mâles

La supplémentation n'a pas d'influence significative ( $\alpha= 0,05$ ) sur la taille des bourdons (estimée sur base de la longueur radiale des ailes antérieures). Soit  $2,7 \pm 1,2$  mm (moyenne  $\pm$  écart-type) pour le pollen de saule contre  $3,6 \pm 1,6$  mm s'il est enrichi de stigmastérol. Nous n'avons pas non plus observé de différences significatives entre les colonies orphelines (blocs). Par contre il existe une interaction entre ces dernières (blocs) et l'alimentation.

### 3. Durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles

D'après l'analyse de la variance, nous avons conclu pour la durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles à une différence significative ( $\alpha= 0,05$ ) entre les aliments testés. Les bourdons ont émergé plus tôt dans les colonies orphelines nourries de pollen supplémenté de stigmastérol, soit après  $39,5 \pm 6,2$  jours (moyenne  $\pm$  écart-type), que dans les colonies nourries avec le pollen, soit après  $49,3 \pm 9,6$  jours (tableau IX). Nous avons également observé des différences très significatives ( $\alpha= 0,01$ )

(tableau IX) entre les colonies orphelines, ainsi qu'une interaction significative entre ces dernières (blocs) et l'alimentation.

#### 4. Nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours

Les différences observées dans le nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours entre les deux types de régimes alimentaires ne sont pas significatives.  $12,7 \pm 4,1$  bourdons ont émergé dans les colonies orphelines nourries avec le mélange à base de pollen de saule non supplémenté en stigmastérol contre  $8 \pm 2,9$  dans le mélange enrichi (tableau IX).

#### 5. Durée de la période précédant l'apparition des premiers cocons

D'après le test khi-carré, les premiers cocons sont apparus en même temps dans les colonies nourries des deux types de régime alimentaire, soit après  $24 \pm 2,8$  jours dans les colonies nourries avec le pollen et après  $23,3 \pm 0,9$  jours dans les colonies orphelines nourries de pollen supplémenté de stigmastérol (tableau IX).

**Tableau X. Tableau récapitulatif des effets des différentes supplémentsations ( $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol) sur les cinq paramètres étudiés sur les bourdons.** (Les tendances non significatives sont entre parenthèses: effet positif (+), négatif (-) ou neutre (0) sur le paramètre étudié. \*\*:  $\alpha=0,01$ ; \*:  $\alpha=0,05$ ). <sup>(1)</sup> L'indication "+" signifie que la durée avant l'émergence est plus courte. <sup>(2)</sup> L'indication "+" signifie que la durée avant le 1er cocon est plus courte.

	Durée de vie	Longueur radiale	Durée avant l'émergence <sup>(1)</sup>	Nombre de mâles	Durée avant le 1er cocon <sup>(2)</sup>
$\beta$ -sitostérol	(-)	(0)	(0)	- **	(0)
cholestérol	- **	(+)	(-)	- **	(-)
stigmastérol	(+)	(+)	+ *	(-)	(+)

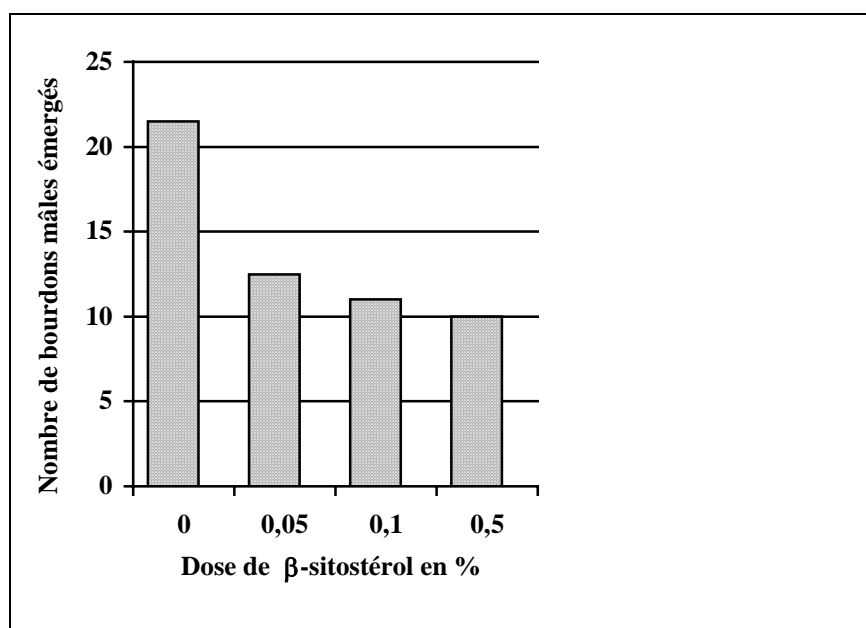


## 2.5. Conclusion partielle

La supplémentation en cholestérol a eu pour effet de diminuer la durée de vie des bourdons mâles et de réduire de façon très significative leur nombre (tableaux VIII, X). Ce dernier résultat est semblable à celui que nous avons obtenu avec une supplémentation en  $\beta$ -sitostérol (tableaux VII, X). En revanche, le stigmastérol influence favorablement le développement des colonies. Son addition au pollen a eu un effet globalement positif sur quatre des cinq paramètres mesurés (tableau X) et statistiquement significatif sur la durée de la période précédant l'émergence de la progéniture (tableau IX).

## 2.6. Influence de suppléments croissantes en $\beta$ -sitostérol

Nous avons étudié l'influence de quantités croissantes (0 à 0,5 % en poids) de  $\beta$ -sitostérol sur le nombre de mâles émergés en 65 jours.



**Figure 22.** Histogramme du nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours en fonction de la teneur en  $\beta$ -sitostérol de leur alimentation (0%; 0,05%; 0,1% et 0,5 %).

Le nombre de bourdons mâles émergés en 65 jours est plus grand dans les colonies nourries de pollen non supplémenté (fig. 22). Il décroît graduellement lorsqu'on augmente la concentration en  $\beta$ -sitostérol de 0,05 à 0,5 %.

### 3. Tests sur l'appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol

#### 3.1. Appétence du $\beta$ -sitostérol

3.1.1. Appétence du  $\beta$ -sitostérol supplémenté aux pollens de colza et de tournesol (lot A et lot B)

Le détail des résultats chiffrés ainsi que les résultats de l'analyse statistique se trouvent aux annexes IV et XX. Le tableau suivant est une synthèse des résultats.

**Tableau XI. Quantités de pollen de colza (lot A) +  $\beta$ -sitostérol , de colza (lot A), de tournesol (lot B) +  $\beta$ -sitostérol et de tournesol (lot B) (g) ingérées par les bourdons dans chaque colonie (bloc).**

Colonies	Pollen et supplémentation	Somme(g)	Répétition	Moyenne(g)	Ecart-type
Bloc 1	Colza+ $\beta$ -sito.	20,83	6	3,47	2,72
	Colza	11,48	6	1,91	1,80
	Tournesol+ $\beta$ -sito.	8,52	6	1,42	1,87
	Tournesol	1,36	6	0,23	0,18
Bloc 2	Colza+ $\beta$ -sito.	26,38	6	4,39	1,16
	Colza	25,91	6	4,31	1,92
	Tournesol+ $\beta$ -sito.	24,61	6	4,1	2,41
	Tournesol	18,25	6	3,04	1,22
Bloc 3	Colza+ $\beta$ -sito.	13,76	6	2,29	1,82
	Colza	12,02	6	2	0,78
	Tournesol+ $\beta$ -sito.	2,51	6	0,41	0,52
	Tournesol	7,45	6	1,24	1,21

Les bourdons ont consommé en 12 jours (6 répétitions) dans les trois colonies (blocs), respectivement 60,97 g de mélange de pollen de colza supplémenté en  $\beta$ -



sitostérol et 35,64 g de mélange de pollen de tournesol supplémenté en  $\beta$ -sitostérol contre respectivement 49,41 g et 27,06 g de pollen non enrichi en stérol (tableau XI). Quelle que soit la nature du pollen testé (Colza, tournesol), celui-ci a été préféré lorsqu'il était supplémenté en 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol.

Nous avons comparé les résultats de nos tests statistiques (selon données reprises en annexe) avec les chiffres de la table de Snedecor à 0,99. Ceci nous a permis de rejeter l'hypothèse de travail H<sub>0</sub>. Ainsi, on peut conclure à une différence d'appétence très significative ( $\alpha= 0,01$ ) entre les quatre régimes alimentaires. La préférence des bourdons allant d'abord au pollen de colza +  $\beta$ -sitostérol, puis dans l'ordre au colza, au tournesol +  $\beta$ -sitostérol et enfin au tournesol.

D'après les résultats statistiques, nous pouvons également conclure à l'existence d'une différence très significative ( $\alpha= 0,01$ ) entre les colonies (le nombre d'individus, de mâles, d'ouvrières, de reines, ainsi que l'âge des colonies diffèrent de l'une à l'autre).

En revanche, il n'y a pas eu d'interaction entre "alimentation" et "colonies", ce qui signifie que les spécificités individuelles n'ont pas influencé l'appétit des colonies.

### 3.1.2. Appétence du $\beta$ -sitostérol supplémenté au pollen de saule (lot C)

Le tableau suivant est une synthèse des résultats. Vous trouverez aux annexes IV et XX le détail des données chiffrées et des analyses statistiques.

**Tableau XII. Quantités de pollen de saule (lot C) +  $\beta$ -sitostérol et de saule (lot C) (g) ingérées par les bourdons dans chaque colonie (bloc).**

colonies	Pollen et supplémentation	Somme (g)	Répétition	Moyenne (g)	Ecart-type
Bloc 1	Saule+ $\beta$ -sitostérol	54,78	9	6,09	0,81
	Saule	73,34	9	8,15	0,70
Bloc 2	Saule+ $\beta$ -sitostérol	61,70	9	6,86	1,31
	Saule	57,91	9	6,43	1,36
Bloc 3	Saule+ $\beta$ -sitostérol	62,59	10	6,26	0,46
	Saule	74,06	10	7,41	0,45
Bloc 4	Saule+ $\beta$ -sitostérol	39,80	6	6,63	1,06
	Saule	54,10	6	9,02	1,54

Contrairement à ce qui avait été observé pour les pollens de colza (lot A) et de tournesol (lot B), l'analyse de la variance n'a pas mis ici en évidence de différences statistiques. Les bourdons n'ont pas montré de préférence particulière pour le pollen de saule (lot C) supplémenté en  $\beta$ -sitostérol. Le régime alimentaire enrichi en  $\beta$ -sitostérol a été consommé dans les mêmes proportions dans les quatre colonies (blocs) 218,87 g en 20 jours (= 10 répétitions) contre 259,41g pour le pollen non enrichi (tableau XII).

Nous n'avons pas mis en évidence de différence entre colonies (blocs) ni d'interaction entre alimentation et colonies, ce qui signifie que les spécificités individuelles n'ont pas influencé l'appétit des colonies.

### 3.2. Appétence du cholestérol

Le tableau suivant est une synthèse des résultats. Vous trouverez aux annexes V et XVIII le détail des données chiffrées et des analyses statistiques .

**Tableau XIII. Quantités de pollen de saule (lot C) et de pollen de saule (lot C) + cholestérol (g) ingérée par les bourdons dans chaque colonie (bloc).**

Colonies	Bloc 1		Bloc 2		Bloc 3	
	Saule+ cholestérol	Saule	Saule+ cholestérol	Saule	Saule+ cholestérol	Saule
Somme (g)	23,46	25,92	33,75	37,88	17,97	19,52
Répétitions	5	5	5	5	5	5
Moyenne (g)	4,69	5,18	6,75	7,58	3,59	3,90
Ecart-type	1,27	0,96	1,29	1,21	2,11	3,07

Les deux régimes alimentaires ont été consommés dans les mêmes proportions, 75,18g en 10 jours (5 répétitions) dans les trois colonies (blocs) pour le pollen supplémenté en cholestérol contre 83,32 g pour le pollen non enrichi (tableau XIII).

L'analyse de la variance à deux critères n'a pas mis en évidence de différences statistiques entre les deux types de diètes. Les deux régimes alimentaires (supplémenté ou non de cholestérol) ont été consommés dans les mêmes proportions.

Nous avons mis en évidence une différence hautement significative ( $\alpha=0,001$ ) entre colonies (blocs). En revanche, il n'y a pas eu d'interaction entre "alimentation" et "colonies".

### 3.3. Appétence du stigmastérol

Le tableau suivant est une synthèse des résultats. Vous trouverez aux annexes VI et XIX le détail des données chiffrées et des analyses statistiques.

**Tableau XIV. Quantité de pollen de saule (lot C) et de saule + stigmastérol (g) ingérées par les bourdons dans chaque colonie (bloc).**

Colonies	Bloc 1		Bloc 2		Bloc 3	
	Saule + stigmastérol	Saule	Saule + stigmastérol	Saule	Saule + stigmastérol	Saule
Somme (g)	38,34	37,64	41,46	43,02	12,24	11,67
Répétitions	6	6	6	6	6	6
Moyenne (g)	6,39	6,27	6,91	7,17	2,04	1,94
Ecart-type	2,65	3,26	2,10	0,75	0,96	0,99

L'analyse de la variance n'a pas mis en évidence de différences statistiques entre les deux types de régimes alimentaires. Les bourdons n'ont pas montré de préférence particulière pour le pollen supplémenté en stigmastérol. Le régime alimentaire enrichi en stérol a été consommé dans les mêmes proportions dans les trois colonies (blocs) 92,04g en 12 jours (= 6 répétitions) contre 92,33 g pour le pollen non enrichi (tableau XIV).

Nous avons mis en évidence une différence hautement significative ( $\alpha= 0,001$ ) entre colonies (blocs). En revanche, pour ce test, il n'y a pas d'interaction entre alimentation et colonies, ce qui signifie que les spécificités individuelles n'ont pas influencé l'appétit des colonies.

### 3.4. Tableau récapitulatif

**Tableau XV. Tableau récapitulatif de l'effet appétent des trois suppléments ( $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol) ajoutés l'alimentation (pollen de saule (lot C), colza (lot A) ou tournesol (lot C)) des colonies de *Bombus terrestris*. (Les tendances non significatives sont entre parenthèses: effet positif (+) ou négatif (-) sur les quantités de pollen ingérées. \*\*:  $\alpha=0,01$ ).**

	Saule (lot C)	Colza (lot A)	Tournesol (lot B)
$\beta$ -sitostérol	(-)	+**	+**
Cholestérol	(-)		
Stigmastérol	(-)		

**4. Stérols corporels de *Bombus terrestris* (L.), comparaison avec la nature et la teneur des stérols contenus dans le corps d'abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.)**

**4.1. Analyses stéroliques**

Le détail des résultats chiffrés est fourni à l'annexe X.

**Tableau XVI. Nature et teneur des stérols contenus dans le corps de bourdons adultes mâles et femelles (*Bombus terrestris*) et d'abeilles domestiques femelles (moyenne calculée à partir de deux échantillons chaque fois) (N.D.: composé non détecté; M.F.: matière fraîche; 24 Méth. Chol.: 24-méthylènecholestérol).**

	mg stérols/100g d'abeilles femelles	% en stérols du corps d'abeilles femelles	mg stérols/100g de reines de bourdons	% en stérols du corps de reines de bourdons	mg stérols/100g de bourdons mâles	% en stérols du corps de bourdons mâles
Cholestérol	0,4	1,3	2,0	3,8	0,7	1,7
Desmostérol	N.D.	N.D.	0,2	0,4	0,2	0,4
24 Méth. Chol.	<b>13,6</b>	<b>42,8</b>	<b>26,6</b>	<b>51,4</b>	<b>25,2</b>	<b>60,3</b>
Stigmastérol	0,2	0,5	0,2	0,3	N.D.	N.D.
$\beta$ -sitostérol	<b>8,3</b>	<b>26,2</b>	<b>12,2</b>	<b>23,6</b>	3,1	7,2
$\Delta$ 5-Avénaatérol	7,3	22,9	10,3	20,0	<b>12,4</b>	<b>29,8</b>
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,5	1,7	0,1	0,2	0,04	0,1
Autres	1,5	4,8	0,2	0,4	0,3	0,6
Stérols totaux (mg/100g M.F.)	31,8		51,7		41,8	

Chez les ouvrières d'abeilles comme chez les reines de bourdons les composants stéroliques suivent le même ordre décroissant, le 24-méthylènecholestérol est le stérol le plus abondant (respectivement 42,8% et 51,4%) suivi du  $\beta$ -sitostérol (respectivement 26,2% et 23,6%), du  $\Delta^5$ -avénastérol (respectivement 22,9% et 20,0%) et du cholestérol (respectivement 1,3% et 3,8%) (tableau XVI).

Chez les bourdons mâles, le taux de 24-méthylènecholestérol est très élevé (60,3%) il est suivi du  $\Delta^5$ -avénastérol (29,8%) du  $\beta$ -sitostérol (7,2%) et du cholestérol (1,6%) (tableau XVI).

#### 4.2. Comparaison de la teneur en stérols des bourdons mâles et d'un pollen nourricier

Le détail des analyses est fourni à l'annexe IX.

**Tableau XVII. Pourcentages en stérols du mélange de pollens à base de Fabacées (lot D).** Moyenne calculée à partir de deux échantillons; détail de l'analyse à l'annexe IX.

\*: Comprend tous les pics dont le temps de rétention est compris entre le cholestérol et la bétuline. (M.S.: matière sèche; 24 Meth. Chol. + Camp.: 24-méthylènecholestérol + campestérol).

Stérols	% en stérols du pollen de Fabacées (lot D)
Cholestérol	16,33
24 Meth. Chol. + Camp.	29,23
Stigmastérol	1,05
Inconnu	14,51
$\beta$ -Sitostérol	6,68
$\Delta$ 5-Avénaestérol	14,34
$\Delta$ 7-Stigmastérol	5,00
$\Delta$ 7-Avénaestérol	6,05
*Teneurs en stérols totaux (mg/g M.S.)	4,39
% en protéines (M.S.)	22



**Tableau XVIII. Teneurs en stérols des bourdons mâles et de leur pollen nourricier (pollen de Fabacées (lot D)).** Moyenne calculée à partir de deux échantillons chaque fois. (M.F.: matière fraîche; N.D.: non détecté; 24 Meth. Chol.: 24-méthylènecholestérol ).

Stérols	mg stérols/ g pollen Fabacées (lot D)	mg stérols/100g de bourdons mâles
Cholestérol	<b>0,55</b>	0,7
Desmostérol	N.D.	0,2
24 Meth. Chol.	<b>0,98</b>	<b>25,2</b>
Stigmastérol	0,03	N.D.
Inconnus	0,49	0,3
$\beta$ -Sitostérol	0,22	<b>3,1</b>
$\Delta$ 5-Avénaastérol	<b>0,48</b>	<b>12,4</b>
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,17	0,04
$\Delta$ 7-Avénaastérol	0,20	N.D.
Teneurs en stérols totaux (M.F.)	3,12 mg/g	41,8 mg/100g

La comparaison des deux colonnes du tableau XVIII met en évidence une différence de répartition des stérols entre les individus et leur alimentation. Dans les tissus de *Bombus terrestris*, le stérol majoritaire est le 24-méthylènecholestérol (25,2 mg/100g), il est suivi du  $\Delta$ 5-avénastérol (12,4 mg/100g) puis du  $\beta$ -sitostérol (3,1 mg/100g). Tandis que le cholestérol est le deuxième composé stérolique le plus représenté dans le pollen de Fabacées (0,55 mg/g), avant le  $\Delta$ 5-avénastérol (0,48 mg/g) et le  $\beta$ -sitostérol (0,22 mg/g).

## 5. Etude de la composition en stérols de prépuces de *Bombus terrestris* (L.) soumises à une alimentation enrichie en $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol

### 5.1. Teneurs et pourcentages des stérols des prépuces de bourdons en fonction de leur alimentation

**Tableau XIX. Concentrations (mg/100g de prépuce) et pourcentages relatifs des différents stérols contenus dans des prépuces de bourdons issues de colonies nourries de pollen de saule (lot C), de pollen de saule + 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol, de pollen de saule + 0,3 % de stigmastérol et de pollen de saule + 0,3 % de cholestérol.** (M.F.: matière fraîche; 24-Méth. Chol.: 24-méthylènecholestérol). Chaque résultat chiffré est la moyenne de six répétitions  $\pm$  l'écart-type. \*, \*\*<sup>(1)</sup>: probabilité de différence significative ( $\alpha=0,05$ ) ou très significative ( $\alpha=0,01$ ) par rapport à la moyenne correspondante pour les prépuces nourries de pollen de saule non supplémenté. Nous avons utilisé le test de randomisation pour effectuer les analyses statistiques.

	Pollen de saule (lot C)		Pollen de saule (lot C) + $\beta$ -sitostérol		Pollen de saule (lot C) + Stigmastérol		Pollen de saule (lot C) + Cholestérol	
	mg stérol/ 100g prépuce	% relatifs en stérol	mg stérol/ 100g prépuce	% relatifs en stérol	mg stérol/ 100g prépuce	% relatifs en stérol	mg stérol/ 100g prépuce	% relatifs en stérol
Cholestérol	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 1,7* <sup>(1)</sup>	6,2 $\pm$ 1,6
24-Méth. Chol.	49,4 $\pm$ 15,9	63,5 $\pm$ 8,3	53,1 $\pm$ 1,6	53 $\pm$ 2,7	47,7 $\pm$ 6,5	54,7 $\pm$ 1,1	37,3 $\pm$ 9,7	54,2 $\pm$ 1,1
Campestérol	1,5 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,9	3,4 $\pm$ 1 ** <sup>(1)</sup>	3,4 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,7	2,1 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,3	2,1 $\pm$ 0,3
Stigmastérol	0,7 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,4	0,2	0,2	6,7 $\pm$ 1,6 ** <sup>(1)</sup>	7,6 $\pm$ 0,8	0,6 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,3
$\beta$ -sitostérol	19,8 $\pm$ 7,5	24,9 $\pm$ 1,6	33,2 $\pm$ 10,7* <sup>(1)</sup>	33,1 $\pm$ 2,8	18,9 $\pm$ 2,5	21,7 $\pm$ 0,4	16,9 $\pm$ 3,6	24,9 $\pm$ 1,2
$\delta$ 5- Avénastérol	10,2 $\pm$ 4,3	12,7 $\pm$ 0,8	11,6 $\pm$ 3,9	11,4 $\pm$ 0,9	9,7 $\pm$ 1,6	11,1 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 1,9	12,5 $\pm$ 0,5
Total stérols (mg/100g MF)	81,9 $\pm$ 28,1		101,9 $\pm$ 31,5		85,4 $\pm$ 12,8		68,9 $\pm$ 16,9	

Le détail des résultats chiffrés se trouve aux annexes XI, XII, XIII et XIV.

D'après le tableau XIX, le pourcentage en cholestérol par rapport aux stérols totaux est très faible dans toutes les prépupes de *Bombus terrestris*, excepté dans celles nourries de la diète supplémentée en cholestérol (6,2 %). Par contre, le 24-méthylènecholestérol est le stérol majoritaire pour tous les échantillons étudiés (de 53 % à 63,5 %) (tableau XIX). Il est suivi du  $\beta$ -sitostérol (de 21,7 % à 33,1 %) et du  $\Delta$ 5-avénastérol ( $\pm$  11 %). Dans le régime alimentaire contrôle des prépupes, le pollen de saule (lot C), les pourcentages relatifs en stérols sont arrangés suivant le même ordre. C'est-à-dire, le 24-méthylènecholestérol suivi du  $\beta$ -sitostérol et du  $\Delta$ 5-avénastérol (tableau VI).

Les teneurs en  $\beta$ -sitostérol et stigmastérol sont, comme pour le cholestérol, plus élevées dans les prépupes nourries de pollen supplémenté en ces stérols que dans les prépupes nourries de pollen non supplémenté (respectivement 33,15 mg/100g pour le  $\beta$ -sitostérol et 6,65 mg/100g pour le stigmastérol contre 19,79 mg/100g et 0,7 mg/100g pour le pollen non supplémenté).

D'après le test statistique, nous avons mis en évidence quelques différences significatives entre les prépupes élevées dans les colonies nourries de pollen supplémenté et celles nourries du pollen non enrichi. Dans les colonies alimentées avec le pollen supplémenté en  $\beta$ -sitostérol les prépupes ont des teneurs en campestérol et en  $\beta$ -sitostérol très significativement ( $\alpha=0,01$ ) et significativement ( $\alpha=0,05$ ) plus grandes qu'avec le régime de base (respectivement 3,41 mg/100g et 33,15 mg/100g contre (1,46 mg/100g et 19,79 mg/100g) (tableau XIX). Dans les colonies nourries de pollen enrichi en stigmastérol, seul celui-ci augmente très significativement dans les prépupes ( $\alpha= 0,01$ ) (6,65 mg/100g contre 0,7 mg/100g avec le pollen non enrichi) (tableau XIX). Dans les colonies nourries de pollen enrichi en cholestérol, seul celui-ci augmente significativement dans les prépupes ( $\alpha= 0,05$ ) (4,31 mg/100g contre 0,5 mg/100g avec le pollen non enrichi) (tableau XIX).

**Tableau XX. Tableau récapitulatif des modifications de teneurs en stérol des prépuces nourries de pollen supplémenté en 0,3% de  $\beta$ -sitostérol, 0,3% de stigmastérol ou 0,3% de cholestérol par rapport aux prépuces nourries du régime alimentaire contrôle. (\*\*:  $\alpha=0,01$ ; \*:  $\alpha=0,05$ . Les tendances non significatives sont entre parenthèses: Augmentation par rapport au régime alimentaire contrôle (pollen non supplémenté) (+), diminution (-) ou *status quo* (0)). (24-Méth. Chol.: 24-méthylènecholestérol).**

Variations des compositions stéroliques des prépuces en fonction de leur alimentation			
Principaux stérols des prépuces	Alimentation des prépuces		
	Pollen (lot C) + $\beta$ -sitostérol	Pollen (lot C) + stigmastérol	Pollen (lot C) + cholestérol
Cholestérol	(0)	(+)	+*
24-Méth. chol.	(+)	(-)	(-)
Campestérol	+**	(+)	(-)
Stigmastérol	(-)	+**	(-)
$\beta$ -sitostérol	+*	(-)	(-)
$\Delta 5$ -Avenastérol	(+)	(-)	(-)

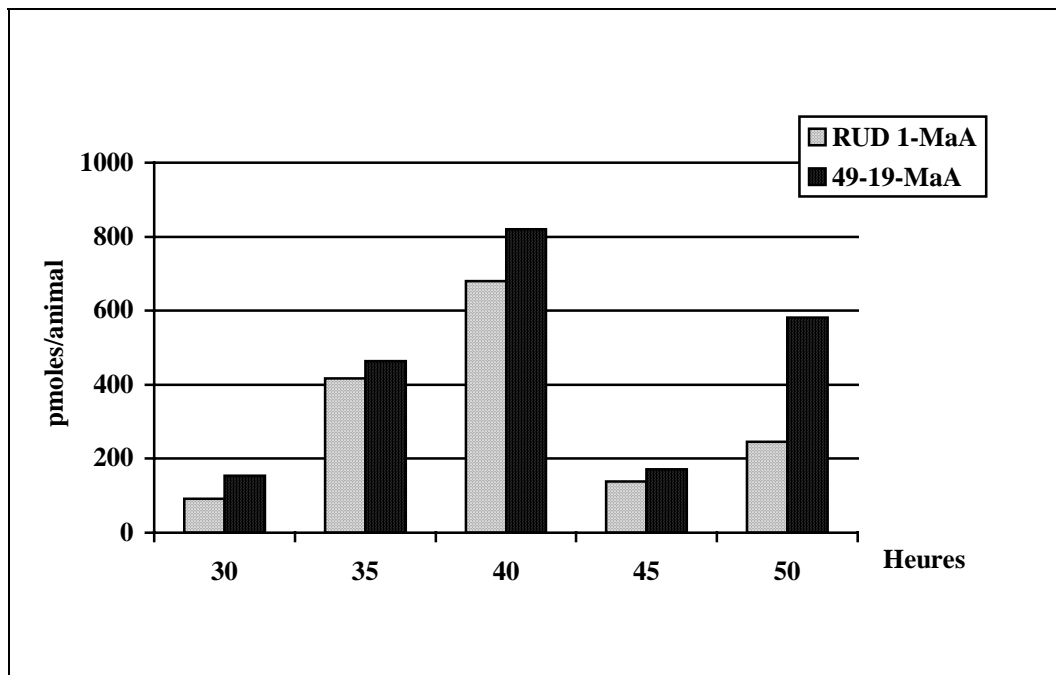
## 6. Analyse de la nature des ecdystéroïdes (hormones de mue) contenus dans les prépuces de *Bombus terrestris* (L.) mâles

### 6.1. Mise en évidence du stade de développement préupal correspondant à une synthèse maximale d'ecdystéroïdes

Les quantités d'ecdystéroïdes mises en évidence sont les plus grandes dans les prépuces prélevées à 40 h. après le début du stade préupal (tableau XXI, fig. 23). C'est le moment optimal pour prélever nos larves.

**Tableau XXI. Picomoles d'ecdystéroïdes mis en évidence à l'aide des anticorps RUD-1 et AS 49-19 dans des bourdons (*Bombus terrestris*) prélevés à 30, 35, 40, 45 et 50 heures après le début de leur stade préupal.**

Temps après le début du stade préupal (heures)	Pmol équ. MaA/prépuce (anticorps RUD-1)	Pmol équ. MaA/prépuce (anticorps AS 49-19)
Blanc	14	3
30 heures	92	153
35 heures	416	463
<b>40 heures</b>	<b>680</b>	<b>819</b>
45 heures	139	171
50 heures	246	582

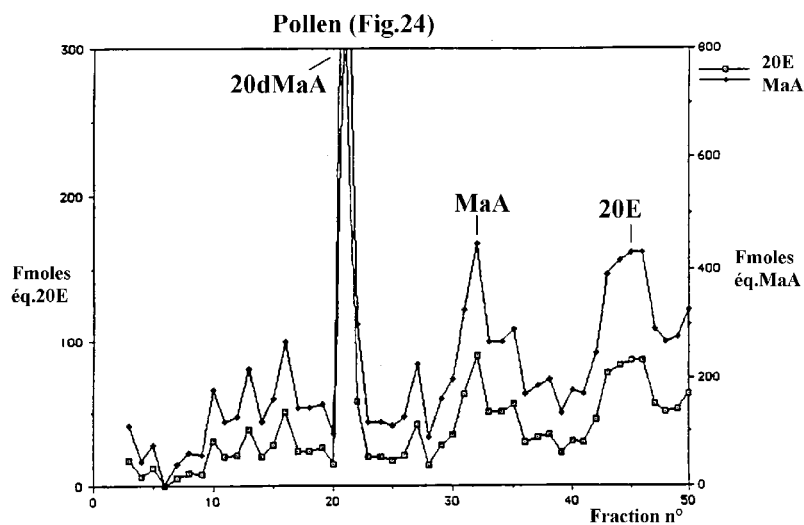


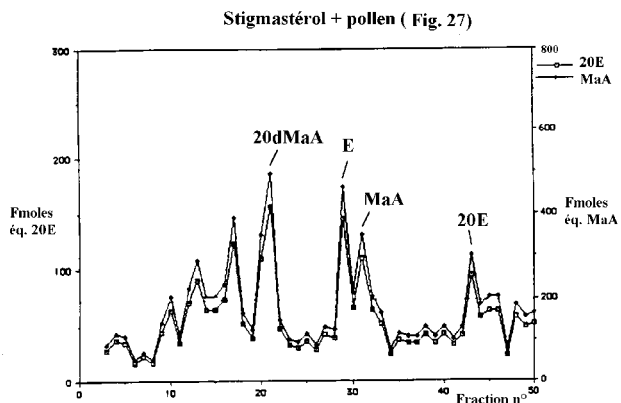
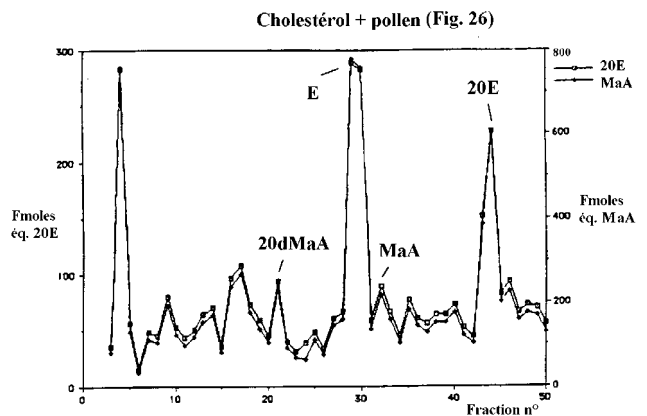
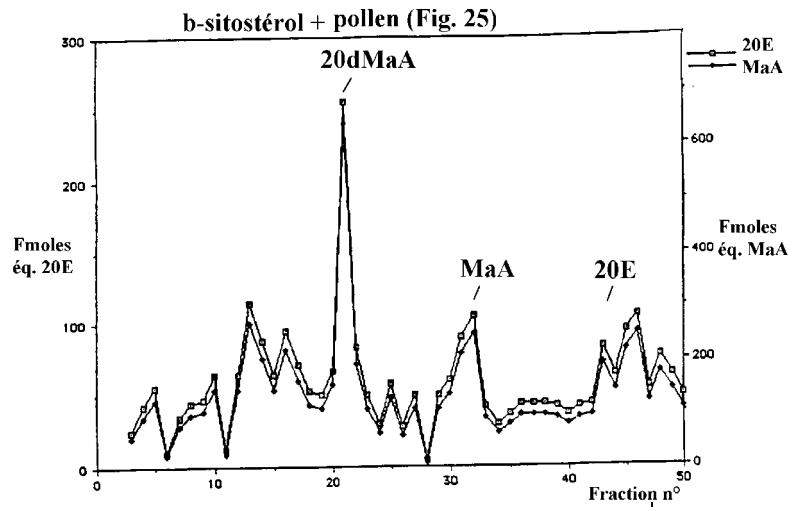
**Figure 23.** Quantité d'ecdystéroïdes mis en évidence par dosage immuno-enzymatique dans la gamme du makistéron avec 2 anticorps (RUD-1 et AS 49-19) dans des prépuces de bourdons mâles *Bombus terrestris* prélevées à 30, 35, 40, 45, et 50 heures après le début du stade prépupal.

## 6.2. Nature des hormones de mue mises en évidence dans les prépuces de *Bombus terrestris* mâles en fonction de leur alimentation

La séparation par H.P.L.C. et le dosage immuno-enzymatique des fractions récoltées a permis de mettre en évidence, malgré la complexité des chromatogrammes, une différence importante dans la nature des composés stéroliques contenus dans les prépuces des bourdons en fonction de leur alimentation.

L'ajout de cholestérol au régime alimentaire change le profil des pics d'ecdystéroïdes par rapport aux profils obtenus avec les trois autres régimes (pollen de saule (lot C), pollen de saule supplémenté en  $\beta$ -sitostérol et pollen de saule supplémenté en stigmastérol). On observe la présence de pics dont le temps de rétention correspond à l'ecdysone (fraction n°30) et à la 20-hydroxyecdysone (fraction n°45) (fig. 26), ces deux ecdystéroïdes ne se retrouvent pas ou plus faiblement dans les autres chromatogrammes. On peut par contre voir sur les trois autres profils des pics dont le temps de rétention correspond à la 20-désoxymakistéron A (fraction n°20) et à la makistéron A (fraction n°30) (fig. 24, 25, 27). Sur le profil des pics correspondant aux ecdystéroïdes formés lors de l'ajout de stigmastérol à la diète, on ne voit pas de pic prédominant mais plutôt quatre pics d'égale importance pouvant correspondre à la 20-désoxymakistéron A, à l'ecdysone, à la 20-hydroxyecdysone et à la makistéron A (fig. 27). Il s'agirait là d'un profil intermédiaire entre celui obtenu par l'ajout de cholestérol et celui obtenu avec l'alimentation contrôle.





**Figures 24, 25, 26 et 27.** Profils des pics correspondant respectivement aux ecystéroïdes formés avec le pollen non enrichi et lors de l'ajout de  $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol au pollen.



## **V. DISCUSSION**

## 1. Nature des stérols polliniques

L'arbousier (*Arbutus unedo* L.) est une plante dont la période de floraison coïncide avec la génération d'hiver de *Bombus terrestris* (Rasmont & Duhayon, 1993). Il constitue la principale source de nourriture pour les bourdons dans le massif des Maures durant tout l'hiver (Rasmont, 1985). Abondamment pollinisées par *Bombus terrestris*, les fleurs de l'arbousier sont délaissées par *Apis* qui se contente de leur nectar (Rasmont & al., 1994). Le pollen d'arbousier ne présente d'autres particularités chimiques que sa teneur importante en  $\beta$ -sitostérol (35,42%) et faible en 24-méthylènecholestérol (2,29%) (tableau IV). Or, il a déjà été montré que le 24-méthylènecholestérol est essentiel dans le cycle de développement d'*Apis mellifera* (Svoboda & al., 1980; 1983; Herbert & al., 1980; Feldlaufer & al., 1986a). Ceci pourrait expliquer le désintérêt des abeilles domestiques pour ce pollen mais soulève une question supplémentaire: quel mécanisme stéroïdien permet à *B. terrestris* de se développer à partir d'une alimentation pauvre en 24-méthylènecholestérol?

On aurait pu aussi penser que la composition stérolique du pollen d'arbousier est caractéristique des pollens à bourdons. Nos résultats montrent que d'autres pollens récoltés principalement ou exclusivement par les bourdons (pollen de tomate, de mélinet, d'aconit tue-loup et du muguet de la Pampa) ne présentent pas de profil stérolique aussi particulier. Les stérols les plus abondants dans ces pollens sont: le  $\beta$ -sitostérol, le 24-méthylènecholestérol et le  $\Delta^5$ -avénastérol (fig.5, tableau IV). Ces stérols sont présents dans de nombreux autres pollens (Barbier, 1971; Takatsuto & Omote, 1989a; Takatsuto & al., 1989; Simal, 1988). Les bourdons s'accommodent donc de pollens aux profils stéroliques forts différents.

*Salpichroa origanifolia* (Lam.) et *Solanum lycopersicum* Dombito (tomate) recherchés par *B. terrestris* sont également visitées par l'abeille domestique. Le pollen de ces fleurs contient

une grande quantité de 24-méthylènecholestérol (tableau IV). Il est donc adapté aux besoins en stérols d'*Apis mellifera*. L'absence de celle-ci et de *B. terrestris* sur les fleurs d'*Aconitum lycoctonum* L. (aconit tue-loup) et de *Cerintho minor* L. (mélinet) ne peut s'expliquer par la composition en stérol de leur pollen. Mais d'autres facteurs peuvent influencer le choix floral.

Les pollens de colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera* (Moench) Delile) et de tournesol (*Helianthus annuus* L.) récoltés notamment par *Apis mellifera* présentent des profils stéroliques différents l'un de l'autre. Le  $\Delta^7$ -avénastérol (43,99%) et le cholestérol (27,17%) sont majoritaires dans le pollen de tournesol et la fraction campestérol + 24-méthylènecholestérol (41,75%) et  $\Delta^5$ -avénastérol (19,21%) sont les plus représentés dans le pollen de colza (tableau IV). Le colza est une plante abondamment pollinisée par les abeilles et les bourdons (Delbrassinne & Rasmont, 1988). Son pollen est riche en protéines (22 % M.S.) et en 24-méthylènecholestérol (41,75 %). Il constitue une alimentation de choix pour ces insectes. Tandis que le pollen de tournesol, plus pauvre en protéine (13 % M.S.) (Hayez, 1993) et en 24-méthylènecholestérol (1,32 %) est une alimentation certainement moins profitable pour *Apis mellifera*. Chez *Bombus terrestris*, le rendement des colonies est significativement plus bas avec du pollen de tournesol qu'avec du pollen de colza (Regali & Rasmont, 1995).

La composition en stérol du pollen de colza concorde avec les résultats de Knights (1968). D'après cet auteur, les deux composants stéroliques principaux de ce pollen sont le 24-méthylènecholestérol (56 % des stérols totaux) et le  $\Delta^5$ -avénastérol (31,6 %) (Knights, 1968). Par contre, ceux rapportés par Standifer et al. (1968) et Takatsuto & Omote (1989b) pour le pollen de tournesol, diffèrent des nôtres. Standifer et al. mettent en évidence une proportion plus importante de  $\beta$ -sitostérol (42 %) pour le pollen de tournesol. La façon dont le pollen a été récolté par Standifer et al. pourrait expliquer le manque de concordance des chiffres (Loper & al., 1980). En effet, le pollen analysé par ces auteurs a été récolté à la main tandis que le nôtre provient directement des pattes des abeilles. Le pollen de tournesol analysé par Takatsuto et al.

contient une majorité de  $\Delta 5$ -avénastérol (42 %) et de sitostérol (20,4 %). Notre analyse, par contre, révèle une majorité de  $\Delta 7$ -avénastérol (43,99 %). Le  $\Delta 5$ -avénastérol et le  $\Delta 7$ -avénastérol ne diffèrent cependant que par une double liaison sur le carbone 5 ou le carbone 7 du noyau stérolique. Cette différence de composition est peut-être d'origine variétale. Takatsuto et al. ont ainsi pu mettre en évidence de grosses différences de composition stérolique entre deux espèces de *Citrus* (Rutaceae). Le sitostérol (49,3 %) et le  $\Delta 5$ -avénastérol (27,1 %) sont les composants stéroliques majoritaires de *Citrus unshiu* Marcov. alors que dans *Citrus sinensis* Osbeck ce sont le  $\Delta 5$ -avénastérol (48,9 %) et le 24-méthylènecholestérol (19,9 %) (Takatsuto & al., 1992). On ne peut discerner de relation phylogénétique simple entre la composition stérolique d'un pollen et la famille à laquelle la plante appartient (Standifer & al., 1968, Borin & al., 1993).

## 2. Qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol

### 2.1. Discussion de la méthode de test

La méthode mise au point semble adaptée à l'étude des besoins nutritionnels de *Bombus terrestris* puisqu'elle a permis de mesurer d'une manière efficace les différences de qualité entre deux régimes alimentaires (Regali & Rasmont, 1995). En particulier, elle permet de marquer une différence nette entre un pollen riche en protéines et un pollen plus pauvre en protéines.

La constitution de colonies orphelines de *Bombus terrestris* permet d'effectuer un nombre important de répétitions. Les ruchettes donnent des résultats dans plus de 90% des cas; dans les cas restants, les ouvrières sont mortes avant d'avoir pondu.

L'utilisation d'ouvrières prélevées au stade nymphal comme fondatrices de colonies orphelines nous a permis de mesurer les paramètres sur une descendance (bourdons mâles) nourrie avec le même régime alimentaire depuis sa conception.

Au cours d'un test sur *Apis mellifera*, Herbert et al. (1980) ont montré que les stérols qui permettaient d'élever la plus grande quantité de couvain étaient ceux-la mêmes qui avaient été consommés en plus grande quantité par les ouvrières. Toutefois, l'effet dû à une consommation plus importante d'une nourriture plus appétente pourrait masquer l'effet physiologique. Herbert et al. (1980) n'ont donc pas bien séparé les effets diététiques dus à l'appétence de ceux d'origine physiologique. Grâce au mode d'alimentation rationné des colonies nous avons pu différencier l'effet sur les paramètres mesurés de l'appétitivité et de la valeur nutritive du régime alimentaire testé (Regali & Rasmont, 1995).

Malgré les spécificités individuelles de chaque colonie orpheline utilisée pour le test et l'interaction significative observée entre colonies orphelines et aliments testés, toutes se sont comportées de la même manière vis-à-vis des régimes alimentaires proposés. Les différences observées d'une colonie à l'autre ne masquent pas les différences entre régimes alimentaires. Des ruchettes avec seulement 5 ouvrières semblent donc suffisantes (Regali & Rasmont, 1995).

## **2.2. Discussion des résultats**

### **2.2.1. Qualité nutritionnelle du $\beta$ -sitostérol**

Nos résultats montrent une différence de rendement en fonction du type de pollen avec lequel les colonies orphelines ont été nourries (tableau VII). Ceci, bien qu'assez logique, n'est pas sans intérêt du point de vue appliqué. En effet, la qualité nutritionnelle varie fort d'un pollen à l'autre. Il y a donc intérêt à sélectionner de manière judicieuse le pollen destiné à l'élevage industriel des colonies de bourdons. Dans le cas présent, la qualité du pollen de tournesol (pollen majoritaire dans le lot B) est assez médiocre. Celui-ci a une teneur en protéine brute de 17,6 % (Rayner & Langridge, 1985) voire même de 13 % (Hayez, 1993) alors que la teneur optimale en protéines pour l'élevage efficace du couvain et la croissance de la colonie d'abeilles domestiques est de 23% (Herbert & al., 1977b). L'autre fraction notable dans le lot B est composée de pollen de Poacées, lui aussi très pauvre en protéines. D'après les résultats de nos analyses le pollen de tournesol a également une teneur en stérols totaux très basse, soit 0,06 % (tableau IV) alors que le pourcentage de stérols dans un pollen est généralement compris entre 0,1 et 0,4 % (Stanley & Linskens, 1974; Viville, 1992). Il n'est pas étonnant que le pollen de colza (pollen majoritaire dans le lot A) qui présente une teneur en protéines de 22 % et en stérols de 0,34 % (tableau IV) donne de meilleurs résultats globaux.

D'après les observations de Rasmont (1985), les colonies de bourdons se contentent plusieurs mois par an d'une alimentation basée sur le pollen d'*Arbutus unedo* dont le composant stérolique majeur est le  $\beta$ -sitostérol (tableau IV). Pourtant, nous montrons clairement que lorsqu'on ajoute du  $\beta$ -sitostérol au régime alimentaire des bourdons (déjà pourvu en 0,5% et 0,8% de stérols totaux dont le 24-méthylènecholestérol, le  $\beta$ -sitostérol et le  $\Delta 5$ -avénastérol), ce stérol provoque une modification du rendement des colonies en diminuant le nombre de la descendance. Soit  $34,8 \pm 8,7$  et  $24,3 \pm 8,4$  individus pour les mélanges riches en pollen de colza (lot A) et de tournesol (lot B) contre  $28 \pm 7$  et  $20,5 \pm 9,1$  individus dans les colonies nourries avec le pollen de colza et de tournesol supplémentés en  $\beta$ -sitostérol (tableau VII).

Chez d'autres groupes d'insectes, l'ajout de  $\beta$ -sitostérol à un régime alimentaire contrôlé ne permet pas d'observer d'effets négatifs sur la progéniture. Ainsi, chez *Heliothis zea* (Boddie) (Lépidoptère, Noctuidae), la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol n'empêche pas le développement larvaire, au contraire, la larve métabolise plus de 85 % de ce stérol en cholestérol (Ritter, 1984). Chez *Apis mellifera*, il permet la formation d'un couvain plus abondant qu'avec l'alimentation contrôlée dépourvue il est vrai de tout stérol (Herbert & al., 1980). En fait, de nombreux insectes sont capables d'utiliser le  $\beta$ -sitostérol. Clayton en a recensé plus de 16 espèces différentes (Clayton, 1964).

Plusieurs explications peuvent être apportées à notre résultat. Le  $\beta$ -sitostérol, à raison de 0,3%, pourrait avoir un effet légèrement toxique. Dans nos conditions expérimentales, on dépasse en effet la teneur en  $\beta$ -sitostérol naturellement présente dans la plupart des pollens. De tels cas de toxicité sont connus chez d'autres insectes. Ainsi, chez *Spodoptera littoralis* Boisduval, l'ajout de 0,1 % de  $\beta$ -sitostérol suffit à réduire la fécondité et la fertilité des femelles (Salama & El-Sharaby, 1972).

Le test de toxicité confirme encore ces résultats. L'effet toxique est bien dû à la supplémentation et s'accroît en même temps qu'elle. D'après la décroissance observée sur le graphique (fig. 22), il ne semble pas y avoir de concentration optimale qui minimise l'effet toxique de l'additif. L'impact nuisible observé au cours des tests nutritionnels ne semble donc pas dû au dépassement d'un seuil. Au cours de recherches sur des substances insecticides et "chémostérilantes", Guerra a mis en évidence des résultats identiques. Il a démontré les effets stérilisants du  $\beta$ -sitostérol administré à *Spodoptera littoralis* Boisduval et *Heliothis* spp. (Lépidoptère, Noctuidae). L'ajout de quantités croissantes de  $\beta$ -sitostérol à l'alimentation de ce dernier (de 0,01 % à 1 %) modifie la fécondité et la fertilité de l'insecte et provoque une diminution grandissante de l'éclosion (Guerra, 1970). Chez ces deux insectes, ce phytostérol affecte également le développement larvaire et pupal en prolongeant leur durée et en occasionnant un amaigrissement des larves (Guerra, 1970).

### 2.2.2. Qualité nutritionnelle du cholestérol

Au cours de cette expérience et de celles qui ont suivi, nous avons apporté une modification majeure au protocole expérimental. Plutôt qu'un mélange de pollens de composition en stérols peu contrôlée et difficilement reproductible (tel que les lots A et B utilisés pour le test sur le  $\beta$ -sitostérol), nous avons choisi comme base de supplémentation un pollen monofloral (le pollen de saule, lot C, dans lequel le 24-méthylènecholestérol représente à lui seul plus de 60 % des stérols totaux, le  $\beta$ -sitostérol plus de 11 %, le  $\Delta^5$ -avénastérol 8% et le cholestérol moins de 1%) (tableau VI).

Pour la majorité des insectes phytophages le peu de cholestérol contenu dans les plantes ne suffit pas à satisfaire leurs besoins, ils sont obligés de le synthétiser à partir des phytostérols des plantes. Ce stérol revêt une grande importance: il est à l'origine de la majorité des hormones



régissant les processus de mue chez l'insecte. Certains insectes semblent pourtant souffrir d'une trop grande concentration de cholestérol dans leur alimentation. C'est notamment le cas d'*Hylemya brassicae* Boddie (Diptère, Anthomyiidae) dont le second processus de mue est gravement perturbé et conduit à une forte mortalité lors de l'ajout de cholestérol à des concentrations même très faibles (0,1 à 0,4 %) à l'alimentation (Dambre-Raes, 1976). Chez *Heliothis zea* (Lépidoptère, Noctuidae), certains paramètres tels que le développement de la larve en un laps de temps déterminé, sa capacité à survivre et à se nymphoser varient avec les concentrations de cholestérol dans le régime alimentaire (Ritter & Nes, 1981). Nous montrons ici que le développement de *Bombus terrestris* est également influencé défavorablement par ce stérol puisque les colonies orphelines nourries du pollen supplémenté en 0,3 % de cholestérol comptent en moyenne deux fois moins de bourdons ( $5 \pm 2,8$  mâles) que les autres colonies ( $11,7 \pm 4,5$  mâles) (tableau VIII).

Ces résultats sont identiques à ceux obtenus lors de l'évaluation de la valeur nutritive du  $\beta$ -sitostérol. Or selon le schéma de désalkylation généralement admis pour d'autres insectes phytophages (Svoboda & al., 1991) (fig. 8) le  $\beta$ -sitostérol est un précurseur du cholestérol. Si ce schéma s'appliquait également aux bourdons, une supplémentation en  $\beta$ -sitostérol aurait, tout comme une supplémentation en cholestérol, pour effet de faire augmenter le "pool" interne de cholestérol participant ainsi à l'effet toxique. La similitude de nos résultats pour ces deux stérols pourrait alors s'en trouver expliquée.

De plus, il est intéressant de constater que le cholestérol administré en doses supplémentaires présente un effet toxique en affectant la durée de vie des bourdons (tableau VIII), tout comme chez les animaux de laboratoire (lapin) et l'homme (Guyton, 1971; Langley, 1971). Or, comme les systèmes vasculaires et respiratoires des insectes sont totalement différents de ceux des vertébrés cette toxicité ne peut être le résultat de phénomènes d'artériosclérose classiquement impliqués dans la toxicité du cholestérol chez l'homme (Smith & Thier, 1981).

### 2.2.3. Qualité nutritionnelle du stigmastérol

Le stigmastérol et le  $\beta$ -sitostérol, sont des phytostérols à 29 carbones. Comme le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol est à la base du processus de métabolisation des stérols en ecdystéroïdes chez certains insectes (fig. 7, 8). Ainsi, par exemple, chez *Manduca sexta* (L.) (Lépidoptère, Sphingidae), le stigmastérol peut être transformé en cholestérol au cours du métabolisme stéroïdien (Svoboda & al., 1995). Chez *Epilachna varivestis* Mulsant (Coléoptère, Coccinellidae) il peut se transformer en un stérol saturé à 27 carbones, le cholestanol puis en lathostérol précurseur de l'hormone de mue (Svoboda & al., 1974).

Nous montrons ici que le stigmastérol influence favorablement le développement des colonies orphelines de *Bombus terrestris*. En effet, au cours de notre test nutritionnel, son addition au pollen de saule (lot C) a eu un effet globalement positif sur quatre des cinq paramètres mesurés (tableau X). La durée de vie des bourdons mâles a augmenté de 4 jours en moyenne; la longueur radiale de leurs ailes était plus longue de 0,5 mm et le premier cocon est apparu un jour plus tôt. L'ajout de stigmastérol a aussi eu un effet favorable statistiquement significatif ( $\alpha=0,05$ ) sur la durée larvaire des individus en diminuant la durée de la période précédant leur émergence (tableaux IX, X). Il est le seul des trois stérols testés à avoir un tel effet globalement positif. Cette observation présente un intérêt du point de vue appliqué. De plus, l'emploi de stigmastérol comme additif dans l'alimentation des bourdons pourrait être envisagé sans problème étant donné son faible coût.

### 3. Appétence du $\beta$ -sitostérol, cholestérol et stigmastérol

La morphologie, la couleur et l'odeur des fleurs jouent un rôle reconnu dans les choix floraux des bourdons (Macior, 1971). Ceux-ci préfèrent des fleurs à couleurs contrastées à des fleurs de teinte uniforme, les tons saturés aux tons clairs, les fleurs à corolle aux stries rayonnantes aux fleurs dépourvues de stries colorées, les fleurs aux contours irréguliers et découpés à des fleurs de formes régulières. Les bourdons se portent plus souvent sur des fleurs dont la corolle est de forme tubulaire (par exemple les lamiacées et les aconits) que sur des fleurs à corolle plate ou convexe (Proctor & Yeo, 1973; Pesson & Louveaux, 1984; Dafni, 1992). On observe également une co-adaptation entre la profondeur des corolles et la longueur des langues des différentes espèces de bourdons (Inouye, 1977a, 1977b, 1978, 1980; Pekkarinen, 1979). Pour certains auteurs la composition chimique du nectar de certaines plantes peut être considérée comme critère de partage des ressources. En guise d'exemple le nectar de *Lathrea clandestina* Lam. est basique et contient de l'ammoniaque dissout. Celui-ci, bien toléré par les bourdons, semble répulsif pour les autres animaux (oiseaux, araignées) (Prys-Jones & Wilmer, 1992). Ceci constitue un cas d'induction de partage des ressources par un moyen biochimique de modification de l'appétence.

D'après les résultats obtenus au cours des tests d'appétence, il semble que d'autres critères de partage des ressources entre insectes liés à l'appétence et à la composition du pollen puissent être dorénavant envisagés.

En effet, nous avons montré que, premièrement, un pollen plus riche en protéines est consommé en plus grande quantité: le pollen de colza (lot A) (teneur en protéines de 21% en M.S. (tableau VI)) a été préféré au pollen de tournesol (lot B) (teneur en protéines de 14% en M.S. (tableau VI)) (tableau XI). Il y a donc bien des différences notables d'appétence d'un pollen à l'autre. Cet effet est accentué par la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol (tableau XI). Par contre, la

supplémentation en divers stérols n'a induit aucun effet appétent ou anti-appétent lorsqu'elle a été appliquée à du pollen de saule (lot C) (tableaux XII, XIII et XIV). L'absence d'effet appétent lorsqu'on ajoute les stérols au pollen de saule (lot C) est peut-être due à la valeur intrinsèque élevée de ce pollen déjà très riche en protéines (27% M.S.) et en stérols totaux (0,4% M.F. (tableau VI)). Concernant le stigmastérol, remarquons que chez d'autres insectes tel *Melanoplus bivittatus* (Say) (Orthoptère, Acrididae) il ne fait pas non plus l'objet de préférence alimentaire et n'a aucun effet sur la croissance ni sur la survie des larves (Harley & Thorsteinson, 1967).

Le  $\beta$ -sitostérol est le premier composé pollinique qui se révèle avoir un effet appétent net dans certaines circonstances sur *Bombus terrestris*. Au contraire, chez l'abeille domestique, le régime synthétique sans stérol est consommé en quantités plus faibles lorsqu'on y ajoute du  $\beta$ -sitostérol que lorsqu'on ajoute du 24-méthylènecholestérol (Herbert & al., 1980). Debaille (1995) établit aussi l'existence d'un partage des ressources entre *Apis mellifera* et *Bombus terrestris* en fonction de la présence de  $\beta$ -sitostérol. Toutefois, celui-ci semble peu net dans le dispositif expérimental employé (Debaille, 1995). Dans la nature, les différences d'appétence pour le  $\beta$ -sitostérol pourraient donc constituer un des critères de partage des ressources entre *Bombus terrestris* et l'abeille domestique. Ainsi, les différences de comportements entre *Bombus terrestris* et *Apis mellifera* envers le pollen d'arbousier pourraient s'expliquer par l'appétence du  $\beta$ -sitostérol, majoritaire dans ce pollen, pour *Bombus terrestris* et son désintéret pour *Apis mellifera* (35,42% de  $\beta$ -sitostérol, 2,29% de 24-méthylènecholestérol (tableau IV)).

Si l'on ajoute à ces résultats, ceux du test sur la qualité nutritionnelle on remarque que, bien qu'appétente, la supplémentation en  $\beta$ -sitostérol n'a pas amélioré le rendement des colonies orphelines (tableaux VII, XI). Le protocole utilisé et, en particulier, le fait d'avoir fourni le régime alimentaire de façon rationnée permet de séparer l'effet appétent de l'effet physiologique. Chez Herbert & al. (1980), en comparaison, l'alimentation était fournie *ad libitum* de telle sorte que les stérols les plus consommés étaient ceux-là mêmes qui permettaient aux ouvrières d'élever

la plus grande quantité de couvain et de vivre le plus longtemps. Cela ne permettait pas de distinguer clairement s'il s'agissait là d'un effet de l'appétence ou plutôt de la nature des stérols étudiés. La méthodologie utilisée ici est donc plus précise.

## 4. Métabolisme stéroïdien et ecdystéroïdien

### 4.1. Stérols tissulaires

La comparaison entre l'analyse en stérol du pollen nourricier (pollen de Fabacées, lot D) et celle des stérols corporels des bourdons adultes permet de mettre en évidence des différences très importantes entre les concentrations, ainsi qu'une différence de répartition des stérols entre les individus et leur alimentation. Quantitativement, le cholestérol est le deuxième stérol du pollen de Fabacées (lot D) (tableau XVII) alors qu'il constitue un des stérols les moins bien représentés au sein des tissus de *B. terrestris* (tableau XVIII). Cette observation distingue *Bombus terrestris* d'autres Hyménoptères phytophages capables de convertir les phytostérols en cholestérol tels les mouches à scie (*Dolerus nitens* Zaddach, *Aneugmenus flavipes* (Norton) et *Xiphydria maculata* Say) (Hymenoptera: Symphyta) (Svoboda & al., 1995). Chez ces insectes la teneur en cholestérol du régime alimentaire est beaucoup plus faible que celle de leur corps. Par contre, le  $\beta$ -sitostérol, phytostérol à l'origine du processus de désalkylation en cholestérol (fig. 8), est beaucoup plus représenté dans l'alimentation que dans les tissus (Svoboda & al., 1995).

Si on ajoute nos résultats à ceux de Svoboda et Lusby (1986) ainsi qu'à ceux plus récents de Svoboda (Svoboda & al., 1995), on peut alors dresser un tableau comparatif des principaux stérols tissulaires de huit Hyménoptères. Ce tableau met en évidence des différences dues à leur alimentation ainsi qu'à leur capacité ou non à désalkyler les phytostérols en cholestérol (tableau XXII). Ainsi, on distingue trois groupes bien particuliers. Le premier groupe est constitué des Hyménoptères phytophages incapables de désalkyler les phytostérols en cholestérol. Les tissus des insectes de ce groupe contiennent principalement du 24-méthylènecholestérol, du  $\beta$ -sitostérol et du  $\Delta^5$ -avénastérol. C'est le cas d'*Apis mellifera* et de *Megachile rotundata* (Fabricius) (Hymenoptera, Megachilidae). Nos résultats montrent que c'est aussi le cas de *Bombus terrestris*

(tableau XVIII). Un deuxième groupe est constitué par des Hyménoptères omnivores et prédateurs. Ces derniers se caractérisent par une concentration très élevée en cholestérol dans leur corps, reflet de leur type d'alimentation. *Dolichovespula maculata*, *Vespula maculifrons* (Hymenoptera, Vespidae) et *Formica exsectoides* (Hymenoptera, Formicidae) en font partie. Le dernier groupe est formé des Hyménoptères phytophages capables de désalkyler les phytostérols en cholestérol. C'est le cas, évoqué ci-dessus, de *Dolerus nitens* et *Aneugmenus flavipes* (Hymenoptera, Symphyta).

Nos analyses permettent également de distinguer les profils stéroliques des bourdons mâles de ceux des femelles. Ces profils diffèrent au niveau du  $\beta$ -sitostérol et du  $\Delta^5$ -avénastérol. En effet, chez les femelles de *Bombus terrestris* la teneur en  $\beta$ -sitostérol est quadruple (12,2 mg/100g) de celle des mâles (3,1 mg/100g). Le  $\Delta^5$ -avénastérol est le deuxième stérol par ordre d'importance chez les bourdons mâles où il représente près de 30 % des stérols totaux contre 23 % des stérols totaux chez les femelles (tableau XVI). Chez les individus de sexes différents, le "pool" de chaque stérol s'adapterait-il (par exemple par action sur les enzymes de transformation) à des besoins particuliers? Des expériences complémentaires devraient venir confirmer ou infirmer cette hypothèse.

**Tableau XXII. Pourcentages relatifs des principaux stérols isolés à partir d'Hyménoptères.**

D'après Svoboda & Lusby, 1986 et Svoboda & al., 1995. Tableau complété avec nos résultats. Tous les échantillons sont issus d'adultes exceptés pour *Apis mellifera* (prépupe) et *Bombus terrestris* (prépupe). Les stérols en quantités négligeables ne sont pas représentés.

Stérols	<i>Bombus terrestris</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Megachile rotundata</i>	<i>Dolichovespula maculata</i>	<i>Vespula maculifrons</i>	<i>Formica exsectoides</i>	<i>Dolerus nitens</i>	<i>Aneugmenus flavipes</i>
Cholestérol	0,7	0,5	0,5	86,5	81,5	69,4	56,6	73
Desmostérol	-	-	-	3,1	5,8	9,4	13,6	6
24-Meth. Chol.	63,5	34,1	34,1	0,6	0,6	-	-	-
Campestérol	1,9	10,4	10,4	3,8	2,6	5,5	7,6	3,6
$\beta$ -sitostérol	24,9	13,0	13,0	3,7	7,8	3,9	17,6	16,9
$\Delta^5$ -	12,7	40,7	40,7	-	-	-	-	-
Avénastérol								
Stigmastérol	0,9	-	-	-	-	-	-	-

## 2.2. Métabolisme stéroïdien

Nous avons mis en évidence quelques variations statistiquement significatives dans les teneurs en stérols des prépupe de *Bombus terrestris* en fonction de l'enrichissement en stérols de leur alimentation (tableau XX). En effet, au cours de notre expérience les prépupe de *Bombus terrestris* nourries de pollen supplémenté en  $\beta$ -sitostérol ont subi une augmentation de leur taux en  $\beta$ -sitostérol mais aussi en campestérol. La teneur en campestérol est doublée par rapport à celle des individus nourris de pollen non supplémenté (3,41 mg/100g contre 1,46 mg/100g pour la diète contrôle); les 8 % de campestérol contenus dans le  $\beta$ -sitostérol supplémenté pourraient être à l'origine de cette augmentation.



Dans les autres cas de notre expérimentation (pollen + cholestérol et pollen + stigmastérol) le seul stérol dont la teneur augmente significativement dans le corps des prépuces est le stérol additionné au régime alimentaire de base (cholestérol et stigmastérol) tous les autres stérols voient leurs concentrations invariées (tableau XIX). Ces résultats sont à mettre en parallèle à ceux obtenus par Svoboda pour l'abeille domestique où le stérol ajouté à la diète se retrouve en quantité plus importante dans les prépuces.

Seule une étude approfondie à l'aide de marqueurs radioactifs nous permettrait de mettre en évidence la nature exacte des transformations chimiques au cours du métabolisme stérolique chez *Bombus terrestris*. Celle-ci n'a pu être envisagée dans le cadre de ce travail.

### **2.3. Métabolisme des ecdystéroïdes**

Premièrement, nous avons montré que le taux d'ecdystéroïdes dans les prépuces de *Bombus terrestris* est maximal à 40 heures après le début du stade prépupal (tableau XXI, fig. 23). Ces résultats sont identiques à ceux rapportés par Strambi (Strambi & al., 1984). Par contre, chez les ouvrières de *B. hypnorum*, le pic d'ecdystéroïdes atteint son maximum plus tôt, on l'observe déjà 30 heures après le début du stade prépupal. Une élévation du taux d'hormones de mue se produit aussi chez l'abeille domestique avant la mue imaginale. Elle atteint son maximum 9 jours après le début du stade pré-nymphal chez l'ouvrière tandis qu'on observe deux élévations chez les reines, l'une s'amorçant pendant le stade pré-nymphal et l'autre avant la mue imaginale (Lensky & al., 1978).

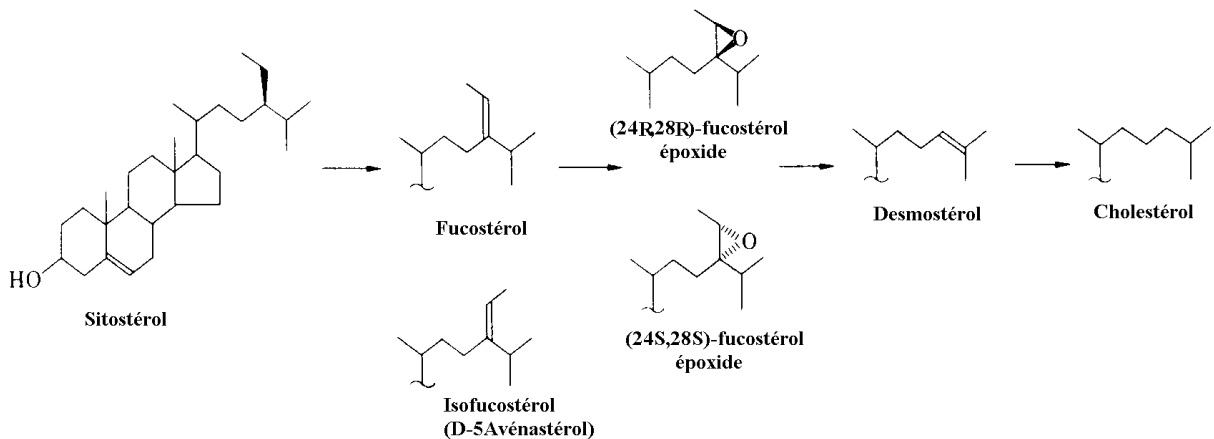
L'étude des ecdystéroïdes a apporté un éclairage supplémentaire aux différences de comportement entre *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*. Lorsqu'on nourrit la colonie de bourdons avec un pollen enrichi en cholestérol (C27), les individus synthétisent

préférentiellement des hormones de mue en 27 carbones, l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone (fig. 26). Tandis que, lorsqu'ils sont nourris de pollen de saule (60% de 24-méthylènecholestérol (C28)) supplémenté ou pas de  $\beta$ -sitostérol (C29), les hormones de mue principales sont les 20-désoxymakistéron A et makistéron A (28 carbones) (fig. 24, 25). La supplémentation en stigmastérol (C27) met en évidence un profil hormonal intermédiaire entre celui du pollen non supplémenté et celui du pollen enrichi en cholestérol où tous les pics se retrouvent (fig. 27). Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster* Herm.) (Diptère, Drosophilidae) et la mouche commune (*Musca domestica* (L.)) (Diptère, Muscidae), le même phénomène de modulation a été mis en évidence (Redfern, 1984; 1986; Feldlaufer & Svoboda, 1991; Feldlaufer & al., 1995). En effet, la composition stérolique du régime alimentaire est en relation directe avec la nature des ecdystéroïdes détectés dans les pupes et secrétés par les glandes en anneau du cerveau (équivalentes des glandes prothoraciques). Les principaux ecdystéroïdes détectés dans les pupes de ces insectes sont l'ecdysone et la 20-hydroxyecdysone avec en plus de la makistéron A chez les individus nourris d'une alimentation contenant du campestérol ou du sitostérol. En revanche, l'abeille domestique ne synthétise qu'un seul type d'hormone de mue, principalement la makistéron A (C28) dont le stérol précurseur est le campestérol (C28) (Feldlaufer & al., 1985; 1986a). Le 20-hydroxyecdysone est absent de l'abeille domestique ou synthétisé en très faible quantité lorsqu'on injecte du cholestérol dans les pupes (Feldlaufer & al., 1986a).

Enfin, on soupçonne l'existence de makistéron C (C29) dans les échantillons de prépupes. Ceci serait cohérent avec la présence de  $\beta$ -sitostérol (C29) dans l'alimentation. Cette hormone à 29 carbones a également été mise en évidence par Feldlaufer (1991) au cours de ces travaux sur *Dysdercus fasciatus* Signoret (Hémiptère, Pyrrhocoridae) (Feldlaufer & al., 1991).

**Tableau récapitulatif de la composition en ecdystéroïdes de prépuces de *Bombus terrestris* élevées dans des colonies orphelines nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté en cholestérol,  $\beta$ -sitostérol ou stigmastérol. 20dMaA: 20-désoxymakistérone A; MaA: makistérone A; 20E: 20-hydroxyecdysone; E: ecdysone.**

Alimentation des prépuces de <i>B. terrestris</i>				
	Pollen de saule	Pollen de saule + $\beta$ -sitostérol	Pollen de saule + stigmastérol	Pollen de saule + cholestérol
Ecdystéroïdes des prépuces de <i>B. terrestris</i>	<b>20dMaA</b> <b>MaA</b>	<b>20dMaA</b> <b>MaA</b>	20dMaA MaA	<b>E</b>
	20E	20 <sup>E</sup>	E 20E	<b>E</b> <b>20E</b>



**Figure 28.** Voie de désalkylation du  $\beta$ -sitostérol (Fujimoto & al., 1984).

La nature des hormones de mue synthétisées par la prépuce de *Bombus terrestris* varie en fonction de son alimentation. *Bombus terrestris*, contrairement à l'abeille domestique, est donc capable d'adapter son métabolisme ecdystéroïdien à des pollens de compositions stéroliques très différentes comme par exemple le pollen d'arbousier.

## **VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVE**

Les bourdons sont des Hyménoptères phytophages. Ils se nourrissent exclusivement de pollen et de nectar, tous deux récoltés dans les fleurs pollinisées par l'insecte. Le nectar est composé essentiellement de sucre et d'eau. En revanche, la composition chimique du pollen est beaucoup plus complexe, hydrates de carbones, eau, minéraux, protéines et lipides y forment un mélange variable suivant la plante. A la base de notre recherche, on trouve le pollen d'arbousier. Ce pollen présente une composition stérolique assez particulière qui pourrait peut-être expliquer le partage des ressources observé sur cette espèce entre *Apis mellifera* et *Bombus terrestris*. Le 24-méthylènecholestérol, phytostérol habituellement très abondant dans les pollens, y représente moins de 3 % des stérols totaux alors que le  $\beta$ -sitostérol avoisine les 40 %. Cette composition stérolique inhabituelle est à mettre en parallèle avec une autre constatation. Délaisé par *Apis mellifera* le pollen de l'arbousier est abondamment récolté par *Bombus terrestris* dont il constitue la principale source de nourriture en hiver dans le Massif des Maures. Ces deux Apoïdes, très proches d'un point de vue taxonomique et ayant généralement les mêmes habitudes alimentaires, adoptent dans le cas d'*Arbutus unedo* un comportement alimentaire différent.

Dans d'autres situations de monolectisme entre plantes et bourdons, les pollens analysés ne révèlent pas de spectre stérolique aussi particulier. Par exemple, les principaux stérols mis en évidence dans les pollens de *Salpichroa origanifolia* (Lam.), *Cerithe minor* L. (mélinet) et de *Solanum lycopersicum* Dombito (tomate) sont le  $\Delta^5$ -avénastérol et le 24-méthylènecholestérol, stérols habituellement abondants dans la majorité des pollens. Le 24-méthylènecholestérol est essentiel pour la croissance et le développement des abeilles domestiques (Svoboda & al., 1991), ce qui pourrait expliquer le désintérêt des abeilles domestiques pour le pollen de l'arbousier, très pauvre en ce stérol.

Dans le cas particulier d'*Arbutus unedo* L. (arbousier), les colonies de bourdons semblent se développer normalement lorsqu'elles sont nourries de ce pollen pauvre en 24-méthylènecholestérol et riche en  $\beta$ -sitostérol. L'étude en laboratoire des effets du  $\beta$ -sitostérol sur

le développement de colonies de *Bombus terrestris* n'apporte pas d'argument supplémentaire à cette constatation, au contraire, l'ajout de 0,3 % de ce stérol à un régime alimentaire de base déjà riche en 24-méthylènecholestérol provoque une diminution de l'effectif des bourdons. Des résultats identiques lors de la supplémentation de cholestérol ainsi qu'un test de toxicité du  $\beta$ -sitostérol montrent que l'effet létal n'est pas dû à une surdose des stérols mais bien à leur seule présence. Pourtant, lorsqu'on lui laisse le choix de son alimentation, *Bombus terrestris* consomme le pollen supplémenté en stérols dans les mêmes proportions que le pollen non enrichi. Malgré leur toxicité, ces stérols n'ont aucun effet anti-appétent. Au contraire même, dans certains cas le  $\beta$ -sitostérol peut se montrer nettement appétent.

Le stigmastérol est le seul stérol à augmenter les performances zootechniques des colonies en diminuant significativement la durée de la période précédant l'émergence de la progéniture lorsqu'il est ajouté à l'alimentation des bourdons. Il n'augmente pourtant pas l'appétence de l'alimentation.

L'analyse stérolique des tissus de *Bombus terrestris* révèle une majorité de 24-méthylènecholestérol suivie du  $\Delta^5$ -avénastérol et du  $\beta$ -sitostérol. Cette répartition est identique à celle de deux autres insectes phytophages de la même famille, *Apis mellifera* et *Megachile rotundata*. Selon Svoboda, la composition stérolique des corps des insectes est le reflet de leurs habitudes alimentaires (Svoboda & Lusby, 1986; Svoboda & al., 1986). Rien d'étonnant dès lors à mettre en évidence des stérols que l'on trouve en abondance dans la plupart des pollens et chez d'autres phytophages.

En comparant le métabolisme stéroïdien des bourdons avec celui des abeilles domestiques nous avons mis en évidence d'autres parallélismes mais aussi une différence importante au niveau du métabolisme ecdystéroïdien. L'analyse stérolique des prépuces nourries de pollen supplémenté en différents stérols met en évidence une augmentation significative de la teneur du

stérol étudié dans le corps des prépupes nourries du pollen enrichi en stérol. Ces résultats sont identiques à ceux obtenus pour l'abeille domestique. Seule une étude plus approfondie au moyen de traceurs radioactifs nous permettrait de tracer les voies de conversion des stérols en ecdystéroïdes, nous pouvons juste à la suite de notre recherche préliminaire affirmer que les suppléments stérols de l'alimentation sont assimilés par les larves de la colonie.

D'après nos résultats, à la différence des abeilles, *Bombus terrestris* est capable de moduler la synthèse de ses hormones de mue en fonction des stérols présents dans son alimentation. Nourries de pollen supplémenté en cholestérol les prépupes synthétisent préférentiellement des ecdystéroïdes à 27 carbones (20-hydroxyecdysone, ecdysone) contre des hormones de mue à 28 carbones (20-désoxymakistérone A, makistérone A) chez les individus élevés avec le pollen supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol. Ces quatre ecdystéroïdes sont synthétisés à égale importance par les prépupes élevées avec le pollen enrichi en stigmastérol. En revanche, l'abeille domestique synthétise principalement la makistérone A (C28) dont le stérol précurseur est le campestérol (C28) (Feldlaufer & al., 1985; 1986a). Le 20-hydroxyecdysone est absent chez l'abeille domestique ou synthétisé en très faible quantité lorsqu'on injecte du cholestérol dans les pupes (Feldlaufer & al., 1986a). Les différences au niveau du métabolisme ecdystéroïdien entre *Bombus terrestris* et *Apis mellifera* pourraient sans doute expliquer en partie leur différence de comportement vis à vis des fleurs de l'arbousier. On comprend mieux dès lors l'attitude de ces deux insectes vis-à-vis du pollen d'*Arbutus unedo*, plus apte à rencontrer les besoins physiologiques de *Bombus terrestris* que d'*Apis mellifera*.

En résumé, cette étude sur les différents aspects de la diététique des stéroïdes alimentaires chez *Bombus terrestris* nous a permis de mettre en évidence:

- l'appétence du  $\beta$ -sitostérol dans certaines conditions bien définies;
- l'effet négatif global du  $\beta$ -sitostérol et du cholestérol sur les paramètres d'élevage des bourdons;
- l'effet positif global du stigmastérol sur les paramètres d'élevage des bourdons;

- les modifications de nature des hormones de mue lors de l'ajout de cholestérol au régime alimentaire;
- la variété des types d'ecdystéroïdes synthétisés lors de l'enrichissement de l'alimentation en stigmastérol. Ces cinq constatations principales et particulièrement les trois dernières différencient *Bombus terrestris* de ce qui est connu chez l'abeille domestique. Il semble donc que le métabolisme des stérols chez ce bourdon ne soit pas identique à celui de l'abeille domestique. Ces différences pourraient être à l'origine de certains phénomènes de partage des ressources observés dans la nature, par exemple vis-à-vis de l'arbousier (*Arbutus unedo* L.).



## **VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Alford, D.V., 1975. *Bumblebees*. Davis-Poynter, London, 352 pp., 16 pls.
- Allais J-P., J. Pain & M. Barbier, 1971. La désalkylation en C<sub>24</sub> du  $\beta$ -sitostérol par l'Abeille *Apis mellifica* L. *C.R. Acad. Sc. Paris, t. 272, série D*: 878-879.
- Anderson L.M. & A. Dietz, 1976. Pyridoxine requirement of the honey bee (*Apis mellifera*) for brood rearing. *Apidologie*, 7(1): 67-84
- Bailey L., 1952. The action of the proventriculus of the worker honeybee, *Apis mellifera* L. *The Journal of Experimental Biology*, 29(2): 310-327.
- Baker H.G., 1977. Non-sugar constituents of nectar. *Apidologie*, 8(4): 349-356.
- Baker H.G. & I. Baker, 1975. Studies of nectar constitution and pollinator plant coevolution. In: L.E. Gilbert & P.H. Raven. *Coevolution of Plants and Animals*. University of Texas Press. 100-140.
- Baker H.G. & I. Baker, 1979. Sugar ratios in nectars. *Phytochemical Bulletin*, 12(3): 43-45.
- Banda H.J. & R.J. Paxton, 1991. Pollination of Greenhouse tomatoes by bees. *Acta Horticulturae*. 6<sup>th</sup> Pollination Symposium, 288: 194-198.
- Barbier M., 1971. Chemistry and Biochemistry of Pollens. In: *Progress in Phytochemistry*, chapter XIII.
- Barker R.J. & Y. Lehner, 1978. Laboratory comparison of high fructose corn syrup, grape syrup, honey, and sucrose syrup as maintenance food for caged honey bees. *Apidologie*, 9(2): 111-116.
- Beck S.D. & J.C. Reese, 1975. Insect-Plant interactions: nutrition and metabolism. In: *Recent advances in phytochemistry*, volume 10, biochemical interaction between plants and insects. Eds Wallace J.W. & R.L. Mansell. Plenum press, New york and London. 41-92.
- Borin M.R. de M.B. & O.R. Gottlieb, 1993. Steroids, taxonomic markers? *Plant Systematic Evolution*, 184: 41-76.
- Bounias M., 1983. Distribution des classes de lipides dans différentes parties du corps de l'Abeille (*Apis mellifica* L.). *C.R. Soc. Biol.*, 177: 14-21.
- Chapman R.F., 1982. The head, ingestion and utilisation of the food. In: *The insects structure and function*. The English Universities Press L. T. D. 3-127.
- Chauvin R., 1968. Biologie et physiologie générale. Tome 1. In: *Traité de biologie de l'abeille*. Masson & co., Paris. 347-377.

- Clark A.J. & K. Bloch, 1959. The Absence of Sterol Synthesis in Insects. *The Journal of Biological Chemistry*, 234(10): 2578-2582.
- Clayton R.B., 1964. The utilization of sterols by insects. *Journal of Lipid Research*, 5: 3-19.
- Crailsheim K., 1988. Regulation of food passage in the intestine of the honeybee (*Apis mellifera* F.). *Journal of Insect Physiology*, 34(2): 85-90.
- Crailsheim K. & M.A. Pabst, 1990. Scanning electron microscopic studies of the proventriculus of the honeybee workers, drones and queens-correlation with feeding behavior. *11<sup>th</sup> international Congress\_IUSSI, India*, p. 124.
- Cruz-Landim C., 1985. Avaliacao fotografica da digestao do polen presente no intestino de operarias de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, apidae). *Naturalia*, Sao Paulo, 10: 27-36.
- Cugnac de A., 1931. Une adventice nouvelle ou encore peu connue en France: *Salpichroa rhomboidea* Miers, à la Baule (Loire-Inférieure). *Bulletin de la Société Botanique de France*, 78: 504-508.
- Dafni A., 1992. Pollination Ecology, A Practical Approach. Chap. 4: advertisement in flowers. In: *The Practical Approach Series*. Eds. D. Rickwood & Hames. Irl press at Oxford University Press. 91-123.
- Dagnelie P., 1975a. *Théorie et méthodes statistiques*. Volume 2. Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux.
- Dagnelie P., 1975b. *Principes d'expérimentation*. Presses agronomiques de Gembloux, Gembloux.
- Dambre-Raes H., 1976. The effect of dietary cholesterol on the development of *Hylemya brassicae*. *Journal of Insect Physiology*, 22: 1287-1289.
- Danielsson H. & T.T. Tchen, 1968. Steroid metabolism, chapter 11. Biosynthesis of Phytosterols. In: *Metabolic pathways, third edition, Vol.II, Lipids, Steroids, and Carotenoids*. Eds. D.M. Greenberg, Academic press.
- Debaille F., 1995. Partage des ressources polliniques entre abeilles domestiques (*Apis mellifera* L.) et bourdons (*Bombus terrestris* (L.)) en fonction de la présence ou de l'absence de  $\beta$ -sitostérol: mise au point d'une méthode expérimentale. Mémoire de fin d'études en Sciences Zoologiques. Service de Zoologie, Université de Mons-Hainaut.
- De Groot A.P., 1953. Protein and amino acid requirements of the honeybee (*Apis mellifica* L.). Volume III. *Physiologia comparata et oecologia*. 196-285.

- De Jonghe R., 1982. Copulation interspécifique en captivité d'espèces du genre *Bombus* Latreille (sensu stricto) (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). *Bull Ann Soc R Belge Entomol*, 118: 171-175.
- De Jonghe R. & P. Rasmont, 1983. Kreuzungsexperiment mit hummeln des genus *Bombus* Latreille sensu stricto (Hymenoptera, Apidae). *Phegea*, 11(1): 7-10.
- De Loof A., T. Briers & R. Huybrechts, 1984. Presence and function of ecdysteroids in adult insects. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 79B(4): 505-509.
- Demol P., 1994. *Etude quantitative de la digestibilité des acides aminés et des stérols chez Bombus terrestris L. (Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'études en Sciences Zoologiques. Service de Zoologie, Université de Mons-Hainaut.
- De Wael L., M. De Greef & O. Van Laere, 1990. La pollinisation par les insectes dans l'horticulture sous verre. *Agricontact*, 222: 1-3.
- Delbrassinne S. & P. Rasmont, 1988. Contribution à l'étude de la pollinisation du colza (*Brassica napus* L. Var. *Oleifera* (Moench) Delile) en Belgique. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 23 (2): 123-152.
- Djegham Y., P. Rasmont, F. Rozenfeld & J.-C. Verhaeghe, 1994. Is *Bombus terrestris* (L.) colony foundation facilitated by the presence of vole (*Microtus Arvalis* (Pallas)) Litter? *12ème congrès de l'Union Internationale pour l'Etude des Insectes Sociaux UIEIS*. p 507. In: A. Lenoir, G. Arnold & M. Lepage, Les insectes sociaux, Paris.
- Donovan B.J. & S.S. Wier, 1978. Development of hives for field population increase, and studies on the life cycles of the four species of introduced bumble bees in New Zealand. *N.Z. Journal of Agricultural Research*, 21: 733-756.
- Duhayon G. & Rasmont P., 1993. Phénologie des grands Apoïdes (Hymenoptera, Apoidea: *Bombus*, *Xylocopa*, *Habropoda*) dans le massif des Maures (France, Var). In: J. Lhonoré, H. Maurin, R. Guilbot & P. Keith. *Inventaire et cartographie des invertébrés comme contribution à la gestion des milieux naturels français*. Muséum National d'Histoire naturelle, Paris. 165-168.
- Dupont P., 1990. *Atlas partiel de la Flore de France*. Secrétariat de la Faune et de la Flore. Collection Patrimoines Naturels, vol. 3. Série Patrimoine Génétique.
- Ebling J. & K.C. Highnam, 1969. Steroids, Growth and change in insects. In: *Chemical Communication*. The Institute of Biology's Studies in Biology n°19. Eds. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Erickson E.H. & E.W. Herbert, JR., 1980. Soybean products replace expeller-processed soyflour for pollen supplements and substitutes. *American Bee Journal*, 122-126.

- Feldlaufer M.F., E.W. Herbert, J.R. & J.A. Svoboda, 1985. Makisterone A the major ecdysteroid from the pupa of the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry*, 15(5): 597-600.
- Feldlaufer M.F., J.A. Svoboda & E.W. Herbert, J.R., 1986a. Makisterone A and 24-methylenecholesterol from ovaries of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experientia*, 42: 200-201.
- Feldlaufer M.F., E.W. Herbert, J.R., J.A. Svoboda & M.J. Thompson, 1986b. Biosynthesis of Makisterone A and 20-Hydroxyecdysone From Labeled Sterols by the Honey Bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 3: 415-421.
- Feldlaufer M.F. & J.A. Svoboda, 1991. Sterol utilization and ecdysteroid content in the house fly, *Musca domestica* (L.). *Insect Biochemistry*, 21(1): 53-56.
- Feldlaufer M.F., G.F. Weirich, W.R. Lusby & J.A. Svoboda, 1991. Makisterone C: A 29-Carbon Ecdysteroid From Developing Embryos of the Cotton Stainer Bug, *Dysdercus fasciatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 18: 71-79.
- Feldlaufer M.F., G.F. Weirich, R.B. Imberski & J.A. Svoboda, 1995. Ecdysteroid Production in *Drosophila melanogaster* Reared on Defined Diets. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 25(6): 709-712.
- Folch J., M. Lees & G.H. Sloane Stanley, 1957. A simple method: the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509.
- Gilliam M., 1979. Microbiology of pollen and bee bread: the yeasts. *Apidologie*, 10(1): 43-53.
- Gilliam M., W.F. Mc Caughey & B. Wintermute, 1980. Amino acids in pollens and nectars of citrus cultivars and in stored pollen and honey from honeybees colonies in citrus groves. *Journal of Apicultural Research*, 19(1): 64-72.
- Guerra A.A., 1970. Effect of Biologically Active Substances in the Diet on Development and Reproduction of *Heliothis* spp. *Journal of Economic Entomology*, 63(5): 1518-1521.
- Guyton A.C., M.D., 1971. Lipid metabolism. In: *Textbook of medical physiology*. Fourth edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto. 808-811.
- Harley K.L.S. & A.J. Thorsteinson, 1967. The influence of plant chemicals on the feeding behavior, development, and survival of the two-striped grasshopper, *Melanoplus bivittatus* (Say), Acrididae: Orthoptera. *Canadian Journal of Zoology*, 45:305-319.
- Hartfelder K., 1993. Structure and function of the prothoracic gland in honey bee (*Apis mellifera* L.) development. *Invertebrate Reproduction and Development*, 23(1): 59-74.

- Haydak M.H. & A. Dietz, 1972. Cholesterol, pantothenic acid, pyridoxine and thiamine requirements of honey bees for broodrearing. *Journal of Apicultural Research*, 11(2): 105-109.
- Hayez C., 1993. *Etude comparative des excréments de Bombus terrestris auct. (Hymenoptera, Apidae)*. Mémoire de fin d'études. Université de Mons-Hainaut. Faculté des Sciences. Laboratoire de Zoologie.
- Heinrich B., 1979. *Bumblebee economics*. Harvard University Press, Cambridge.
- Herbert E.W., JR., 1979. A new ash mixture for honey bees maintained on a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research*, 18(2): 144-147.
- Herbert E.W., JR. & H. Shimanuki, 1977. Brood-rearing capability of caged honeybees fed synthetic diets. *Journal of Apicultural Research*, 16(3): 150-153.
- Herbert E.W. JR. & H. Shimanuki, 1978a. Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *Journal of Apicultural Research*, 17(3): 118-122.
- Herbert E.W. JR. & H. Shimanuki, 1978b. Effect of thiamine- or riboflavin- deficient diet fed to new emerged honey bees, *Apis mellifera* L. *Apidologie*, 9(4): 341-348.
- Herbert E.W. JR. & Shimanuki, 1983. Effect of diet pH on the consumption, brood rearing, and pH of worker jelly produced by caged honey bees. *Apidologie*, 14(3):191-196.
- Herbert E.W. JR., H. Shimanuki & D. Caron, 1977a. Caged honey bees (Hymenoptera, Apidae): comparative value of some proteins for initiating and maintaining brood rearing. *Apidologie*, 8(3): 229-235.
- Herbert E.W. JR., H. Shimanuki & D. Caron, 1977b. Optimum protein levels required by honey bees (Hymenoptera, Apidae) to initiate and maintain brood rearing. *Apidologie*, 8(2): 141-146.
- Herbert E.W., J.R., J.A. Svoboda, M.J. Thompson & H. Shimanuki, 1980. Sterol utilisation in honey bees fed a synthetic diet: effects on brood rearing. *Journal of Insect Physiology*, 26: 287-289.
- Herbert E.W., J.R., J.A. Svoboda, M.J. Thompson & H. Shimanuki, 1981. Sterol requirements for brood rearing by honey bees fed a synthetic diet. *American Bee Journal*, 121(7): 523.
- Herrera C.M., 1990. Bumble bees feeding on non plant-food sources. *Bee World*, 67-69.
- Inouye D., 1977a. Species Structure of Bumblebee Communities in North America and Europe. In: Mattson, W.J., *The role of Arthropods in forest ecosystems*. Springer, Berlin-Heidelberg- New-york. 35-49.

- Inouye D., 1977b. Resource partitioning in bumblebees. *New York entomological Society*, 85(4): 253-254.
- Inouye D., 1978. Resource partitioning in bumblebees: experimental studies of foraging behavior. *Ecology*, 59(4): 672-678.
- Inouye D., 1980. The Effect of Proboscis and Corolla Tube Lengths on Patterns and Rates of Flower Visitation by Bumblebees. *Oecologia*, 18: 1-5.
- Kaplanis J.N., W.E. Robbins, H.E. Vroman & B.M. Bryce, 1963. The absence of cholesterol biosynthesis in a primitive insect-- the firebrat, *Thermobia domestica* (Packard). *Steroids*, 2(5): 547-553.
- Kaplanis J.N., M.J. Thompson, S.R. Dutky & W.E. Robbins, 1979. The ecdysteroids from the tobacco hornworm during pupal-adult development five days after peak titer of molting hormone activity. *Steroids*, 2477:33-345.
- Knights B.A., 1968. Studies in the cruciferae: sterols in pollen of *Brassica Napus* L.. *Phytochemistry*, 7: 1707-1708.
- Kritchevsky D., 1963. Sterols, chapter I. In: *Comprehensive Biochemistry, volume 10, Sterols, Bile acids and Steroids*. Eds. M.Florkin & E.H. Stotz, Elsevier publishing company.
- Kroon G.H., J.P. Van Praagh & H.H.W. Velthuis, 1974. Osmotic shock as a prerequisite to pollen digestion in the alimentary tract of the worker honeybee. *Journal of Apicultural Research*, 13(3): 177-181.
- Kwak M.M., 1987. Marking a bumblebee without anaesthesia. *Bee World*, 68(4): 180-181.
- Lafont R., J.-L. Penneret & M. Andrianjafintrimo, 1982. Sample processing for high-performance liquid chromatography of ecdysteroids. *Journal of Chromatography*, 236: 137-49.
- Langley, L.L., 1971. Intermediary Metabolism. In: *Physiology of Man*. Fourth edition. Van Nostrand Reinhold Company, pp. 563-565.
- Lehner Y., 1983. Nutritional considerations in choosing protein and carbohydrate sources for use in pollen substitutes for honeybees. *Journal of Apicultural Research*. 22(4): 242-248.
- Lehninger, A., L., 1981. Lipids, Lipoproteins, and Membranes. In: *Biochemistry*, chapter 11, second Edition. Worth Publishers, inc. 279-307.
- Lensky Y., J.-C. Baehr & P. Porcheron, 1978. Physiologie des insectes.- Dosages radio-immunologiques des ecdysones et des hormones juvéniles au cours du développement post-embryonnaire chez les ouvrières et les reines d'Abeille (*Apis mellifica* L. var. *ligustica*). *Compte Rendu de l'Académie des Sciences de Paris, série D*, 287: 821-824.

- Litardière de R., 1955. *Prodrome de la flore corse*, commencé par J. Briquet. T. III, partie 2, (XVII + 264pp.)
- Lognay G., P. Dreze, P.J. Wagstaffe, M. Marlier & M. Severin, 1989. Validation of a quantitative procedure for the extraction of sterols from edible oils using radiolabelled compounds. *Analyst*, 114: 1287-1291.
- Lognay G., A. Boenke, P.J. Wagstaffe & M. Severin, 1992. Edible fats and oils reference materials for sterol analysis with particular attention to cholesterol. Part I. Investigation of some analytical aspects by experienced laboratories. *The Analyst*, 117(7): 1093-1097.
- Loper G.M., L.N. Standifer, M.J. Thompson & M. Gilliam, 1980. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. 1. -Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. *Apidologie*, 11(1): 63-73.
- Lozano R., M.J. Thompson, J.A. Svoboda & W.R. Lusby, 1989. Profiles of Free and Conjugated Ecdysteroids and Ecdysteroid Acids During Pupal-Adult Development of *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 12: 63-74.
- Macfarlane R.P., 1976. The Proventriculus of Adult Bumble Bees (Bombinae, Apidae). *The New Zealand Entomologist*, 6(2): 189.
- Macfarlane R.P. & A.M. Ferguson, 1983. Kiwifruit pollination: a survey of the insect pollinators in New Zealand. In: *Symposium International sur la pollinisation. Versailles*. INRA Publ., 1984. (Les colloques de l'INRA, n°21). 435-441.
- Macior L.W., 1971. Co-evolution of plants and animals systematic insights from plant-insect interactions. *Taxon*, 20(1): 17-28.
- Marot C., 1992. *Contribution à la diététique de Bombus terrestris auct.: analyse du nectar et du miel d'arbousier (Arbutus unedo L.)*. Mémoire de fin d'études en Sciences Chimiques. Service de Chimie Biologique, Université de Mons-Hainaut.
- Maurer P., C. Royer, B. Mauchamp, P. Porcheron, D. Debieu & G. Riba, 1991. Occurrence of 28- and 27-Carbon Ecdysteroids and Sterols in Developing Worker Pupae of the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae: Attini). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 16: 1-9.
- Maurer P., J-P. Girault, M. Larchevêque & R. Lafont, 1993. 24-Epi-Makisterone A (Not Makisterone A) Is the Major Ecdysteroid in the Leaf-Cutting Ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera, Formicidae: Attini). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 23: 29-35.



- Mc. Caughey W.F., M. Gilliam & L.N. Standifer, 1980. Amino acid and protein adequacy for honey bees of pollens from desert plants and other floral sources. *Apidologie*, 11(1): 75-86.
- Medler J.T., 1962. Morphometric studies on bumblebees. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 55: 212-218.
- Moore P.D., J.A. Webb & M.E. Collinson, 1991. Pollen grains and spores. In: *Pollen analysis*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 62-64.
- Navez B. & P. Budin, 1990. Pollinisation des tomates sous serre en Provence. Utilisation des bourdons. Bilan d'une première année. *P.H.M.- Revue Horticole*, 310: 29-32.
- Novak V.J.A., 1975. *Insect hormones*. Chapman and Hall, London. 99-113.
- O'Toole C. & A. Raw, 1991. Bees and Flowers, chapter 11. In: *Bees of the World*. Eds A Blandford, Villiers House, Strand, London.
- Pekkarinen A., 1979. Morphometric, colour and enzyme variation in Bumblebees (Hymenoptera, Apidae, Bombus). In: Fennoscandia and Denmark. *Acta Zoologica Fennica*, 158: 1-60.
- Peng Y-S., M.E. Nasr, J.M. Marston & Y. Fang, 1985. The digestion of dandelion pollen by adult worker honeybees. *Physiological Entomology*, 10: 75-82.
- Pesson P. & J. Louveaux, 1984. L'abeille domestique dans ses relations avec les plantes cultivées. In: *Pollinisation et productions végétales*, I.N.R.A., Paris.
- Plowright R.C. & C.M.S. Plowright, 1990. The laying of male eggs by bumble bee queens: an experimental reappraisal and a new hypothesis. *Canadian Journal of Zoology*, 68: 493-497.
- Porcheron P., J. Foucrier, C. Gros, P. Pradelles, P. Cassier & F. Dray, 1976. Radioimmunoassay of arthropods moulting hormone:  $\beta$ -ecdysone antibodies production and  $^{125}\text{I}$ -iodinated tracer preparation. *Febs Lett.*, 61: 159-162.
- Porcheron P., M. Moriniere, J. Grassi & P. Pradelles, 1989. Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochemistry*, 19(2): 117-122.
- Pouvreau A., 1974. Le comportement alimentaire des bourdons (Hymenoptera, Apoidea, Bombus Latr.). *Apidologie*, 5(3): 247-270.
- Proctor M. & P. Yeo, 1973. *The pollination flowers*. The New Naturalist, Collins, London.
- Prys-Jones O.E. & P.G. Willmer, 1992. The biology of alkaline nectar in the purple toothwort (*Lathraea clandestina*): ground level defences. *Biological Journal of the Linnean Society*, 45: 373-388.

- Purdie R.W., D.E. Symon & L. Haegi, 1982. Solanaceae. In: *Flora of Australia*. Vol. 29, (VII + 208 pp.).
- Rasmont P., 1985. *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae) dans le Massif des Maures (France, Var), une génération d'hiver? *Bulletin et Annales de la Société Royale belge d'Entomologie*, 120: 359-363.
- Rasmont P. 1988 Monographie écologique et zoogéographique des bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). Thèse de doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, 309+62pp.
- Rasmont P., A. Regali, G. Lognay, E. Baudart, P. Viville, C. Marot, P. Falmagne & J.-C. Verhaeghe, 1994. Bumblebee foraging: Is there a resource partitioning with *Apis mellifera* L. based on pollen sterolic fraction? 12ème congrès de l'Union Internationale pour l'Etude des Insectes Sociaux UIEIS. In: A. Lenoir, G. Arnold & M. Lepage, *Les Insectes Sociaux*, Paris.
- Rayner C.J. & D.F. Langridge, 1985. Amino acids in bee-collected pollens from Australian indigenous and exotic plants. *Aust. J. Agric.*, 25:722-726.
- Redfern C.P.F., 1984. Evidence for the presence of makisterone A in *Drosophila* larvae and the secretion of 20-deoxymakisterone A by the ring gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5643-5647.
- Redfern C.P.F., 1986. Changes in patterns of ecdysteroid secretion by the ring gland of *Drosophila* in relation to the sterol composition of the diet. *Experientia*, 42: 307-309.
- Regali A. & P. Rasmont, 1995. Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez des colonies orphelines de *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera, Apidae). *Apidologie*, 26: 273-281.
- Regali A., P. Rasmont & E. Baudart, 1994. First experiments on the amino-acids diet supplementation for *Bombus terrestris* (L.). 12ème congrès de l'Union Internationale pour l'Etude des Insectes Sociaux UIEIS. In: A. Lenoir, G. Arnold & M. Lepage, *Les insectes sociaux*, Paris. P. 507.
- Richards K.W., 1973. Biology of *Bombus polaris* and *B. hyperboreus* Schönherr at lake Hazen. Northwest territories (Hymenoptera: Bombini). *Quaestiones entomologicae*, 9: 115-157.
- Rikli M., 1943. *Das Pflanzenkleid der Mittelmeerländer*. Vol. I. Bern.
- Ritter K.S. & W.R. Nes, 1981. The effects of cholesterol on the development of *Heliothis zea*. *Journal of Insect Physiology*, 27(3): 175-182.

- Ritter K.S., 1984. Metabolism of  $\Delta^0$ -,  $\Delta^5$ -, and  $\Delta^7$ - Sterols by Larvae of *Heliothis Zea*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 1: 281-296.
- Roberts J.D., Caserio M.C., 1977. La chimie des produits naturels. Chapitre 30. In: *Chimie Organique Moderne*. InterEditions, Paris. 785-795.
- Robinson G.E., C. Strambi, A. Strambi & M.F. Feldlaufer, 1991. Comparaison of juvenile hormone and ecdysteroid haemolymph titres in adult worker and queen honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 37(12): 929-935.
- Röseler P.-F., 1991. Roles of morphogenetic hormones in caste polymorphism in Bumble bees. In: A. P. Gupta. *Morphogenetic hormones of arthropods. Roles in histogenesis, organogenesis and morphogenesis*. Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey.
- Rousseau S., 1994. *Les relations co-adaptatives des Aconits (Ranunculaceae, Aconitum L.) de Belgique et des Pyrénées avec leurs bourdons pollinisateurs (Hymenoptera, Apidae, Bombinae)*. Mémoire de fin d'études en Sciences Zoologiques. Service de Zoologie, Université de Mons Hainaut.
- Royer C., P. Porcheron, P. Pradelles & B. Mauchamp, 1993. Development and Use of an Enzymatic Tracer for an Enzyme Immunoassay of Makisterone A. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 23(1): 193-197.
- Royer C., P. Porcheron, P. Pradelles, L. Kerhoas, J. Einhorn & B. Mauchamp, 1995. Rapid and Specific Enzyme Immunoassay for Makisterone A. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 25(2): 235-240.
- Sakagami S.F., Y. Akahira & R. Zucchi, 1967. Nest architecture and brood development in a Neotropical Bumblebee, *Bombus atratus*. *Insectes sociaux*, 14(4): 389-413.
- Salama H.S. & A.M. El-Sharaby, 1972. Giberellic Acid and  $\beta$ -sitosterol as Sterilants of the Cotton Leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisduval. *Experientia*, 28(4): 413-414.
- Siddall J.B., 1970. Chemical Aspects of Hormonal Interactions, chapter 11, Steroidal Molting Hormones. In: *Chemical Ecology*. Eds. Sondheimer E. & J.B. Simeone, Academic Press.
- Siegel S., 1956.  $\chi^2$  test for two independent samples & randomization test for two independent samples. In: *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. Chapter 6. Mc Graw-Hill book company, second edition. 104-111; 152-156.
- Simal J., J.F. Huidobro & S. Muniategui, 1988. Estudio de la fraccion esterolica del polen apicola. *Grasas y Aceites*, 39(6): 327-332.
- Skorikov A.S., 1922. Shmeli paleartiki. Chast I. Obshchaya biologiya (so vklyucheniem zoogeografii). Les bourdons de la faune paléarctique. Partie I. Biologie générale (la

zoogéographie y compris). *Izvestiya Severnoi Oblastnoi Stantsii Zashchity Rastenii ot Vreditel'ei*, 4: 1-160, 17 maps.

Smith L.H. Jr. & S.O. Thier, 1981. Atherosclerosis, Pathophysiology of cardiovascular disease. In: *Pathophysiology, The Biological Principles of Disease*. W.B. Saunders Company. 1162-1167.

Snodgrass R.E., 1956. *Anatomy of the Honey Bee*. Comstock Publishing Associates, a division of Cornell University Press.

Stace C., 1991. *New flora of the British Isles*. Cambridge University Press, (XXX + 1226pp.).

Standifer L.N., M.H. Haydak, J.P. Mills & M.D. Levin, 1973. Value of three protein rations in maintaining honeybee colonies in outdoor flight cages. *Journal of Apicultural Research*, 12(3): 137-143.

Standifer L.N., M. Devys & M. Barbier, 1968. Pollen sterols\_A mass spectrographic survey. *Phytochemistry*, 7: 1361-1365.

Stanley R.G. & H.F. Linskens, 1974. Organic Acids, Lipids and Sterols, chapter 10. In: *Pollen Biology Biochemistry Management*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

Strambi A., C. Strambi, P.-F. Röseler & I. Röseler, 1984. Simultaneous Determination of Juvenile Hormone and Ecdysteroid Titters in the Hemolymph of Bumblebee Prepupae (*Bombus hypnorum* and *B. terrestris*). *General and comparative endocrinology*, 55: 83-88.

Svoboda J.A. & W.R. Lusby, 1986. Sterols of Phytophagous and Omnivorous Species of Hymenoptera. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 3: 13-18.

Svoboda J.A., M.J. Thompson, W.E. Robbins & T.C. Elden, 1974. Unique Pathways of Sterol Metabolism in the Mexican Bean Beetle, A Plant- Feeding Insect. *Lipids*, 10(9): 524-527.

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

Svoboda J.A., E.W. Herbert, J.R., M.J. Thompson & H. Shimanuki, 1981. The fate of radiolabelled C28 and C29 phytosterols in the honey bee. *Journal of Insect Physiology*, 27(3): 183-188.

Svoboda J.A., E.W. Herbert, J.R. & M.J. Thompson, 1983. Definitive evidence for lack of phytosterol dealkylation in honey bees. *Experientia*, 39: 1120-1121.

Svoboda J.A., E.W. Herbert, J.R. & M.J. Thompson, 1986a. Sterols of organs involved in brood food production and of royal jelly in honey bees. *Insect Biochemistry*, 16(3): 479-482.

- Svoboda J.A., E.W. Herbert, J.R., M.J. Thompson & M.F. Feldlaufer, 1986b. Selective Sterol Transfer in the Honey Bee: Its Significance and Relationship to Other Hymenoptera. *Lipids*, 21(1): 97-101.
- Svoboda J.A., R.B. Imberski & W.R. Lusby, 1989. *Drosophila melanogaster* does not dealkylate (14C) sitosterol. *Experientia*, 45: 983-985.
- Svoboda J.A., G.F. Günter & M.F. Feldlaufer, 1991. *Physiology and Biochemistry of sterols*. G. W. Patterson, W. D. Nes. American Oil Chemist Society: chapter 10, recent Advances in Insect Steroid Biochemistry.
- Svoboda J.A., N.M. Schiff & M.F. Feldlaufer, 1995. Sterol composition of three species of sawflies (Hymenoptera: Symphyta) and their dietary plant material. *Experientia*, 51: 150-152.
- Taiz L. & E. Zeiger, 1991. Surface protection and secondary defense compounds. In: *Plant Physiology*. Chapter 13. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc. P. 326.
- Takatsuto S. & K. Omote, 1989a. Analysis of Phytosterols in the Pollen of *Vicia faba* L. by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(1): 259-261.
- Takatsuto S. & K. Omote, 1989b. Phytosterol Composition in the Pollen of Sunflower, *Helianthus annuus* L.. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(12): 3363-3364.
- Takatsuto S., K. Omote & T. Kitsuwa, 1989. Phytosterol Composition in the Pollen of Buckwheat, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Agricultural Biological Chemistry*, 53(8): 2277-2278.
- Takatsuto S., K. Omote & C. Motegi, 1992. Sterol composition in the pollens of Citrus unshiu Marcov. and Citrus sinensis Osbeck. *Biosc. Biotech. Biochem.*, 56(4): 670-671.
- Thompson M.J., J.A. Svoboda & G.F. Weirich, 1984. Ecdysteroids in developing ovaries and eggs of the tobacco hornworm. *Steroids*, 43(3): 333-341.
- Todd F.E. & O. Bretherick, 1942. The Composition of Pollens. *Journal of Economical Entomology*, 35: 312-316.
- Velthuis H.H.W., 1992. Pollen digestion and evolution of sociality in bees. *Bee World*
- Viville P., 1992. *Contribution à la connaissance de la diète de Bombus terrestris auct.: analyse du pollen d'Arbutus unedo*. Mémoire de fin d'études en Sciences Chimiques. Service de chimie biologique. Université de Mons-Hainaut.
- Von Frisch K., 1969. *Vie et Moeurs de Abeilles*. Eds. Albin Michel. 30-43.

- Von Gliscynski U., J.P. Delbecque, D. Böcking, D. Sedlmeier, H. Dircksen & R. Lafont, 1995. Three new antisera with high sensitivity to ecdysone, 3-dehydroecdysone and other A-ring derivatives: Production and characterization. *Eur. J. Entomol.*, 92:75-79.
- Willmer P.G., A.A.M. Bataw & J.P. Hughes, 1994. The superiority of bumblebees to honeybees as pollinators: insect visits to raspberry flowers. *Ecological Entomology*, 19: 271-284.
- Yakovlev A.S., 1969. Utilization of cobalt as a stimulant for brood rearing. *XXII Int. Beekeep. Congr. Summ.*:133; 159-166 of *Apicultural Abstract* 320/70.

**VIII. ANNEXES**









89			
92			
94			

**Tableau IV. Nombre de bourdons mâles émergés dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot A (colza) ou du lot B (tournesol) supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol.**

Nombre de <i>B. terrestris</i> mâles															
Pollen de colza (lot A)								Pollen de tournesol (lot B)							
Non supplémenté				Supplémenté en $\beta$ -sitostérol				Non supplémenté				Supplémenté en $\beta$ -sitostérol			
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4
32	40	22	45	36	24	34	18	11	32	31	23	13	10	28	31

**Tableau V. Durée de la période précédant l'apparition du premier cocon (jours) dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot A (colza) ou du lot B (tournesol) supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol.**

Durée de la période précédant l'apparition du premier cocon de <i>B. terrestris</i> (jours)															
Pollen de colza (lot A)								Pollen de tournesol (lot B)							
Non supplémenté				Supplémenté en $\beta$ -sitostérol				Non supplémenté				Supplémenté en $\beta$ -sitostérol			
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4
28	25	22	28	28	26	22	28	58	28	23	34	38	47	22	31





**Tableau VIII. Durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles (jours) dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en cholestérol.**

Durée de la période précédant l'émergence des <i>B. terrestris</i> (jours)											
Pollen de saule (lot C)											
Non supplémenté						Supplémenté en cholestérol					
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6
30	33	32	34	32	29	40	35	37	39	32	32
31	33	32	34	32	30	42	35	37	39	33	32
31	34	34	37	32	33	42	35	47	40	33	35
31	35	35	37	33	33	42	35			39	
33	35	35	50	33	33		37			39	
34	35	35	50	33	38		36				
34	35	35	57	37	39		36				
35	37	35	62	43			41				
35	37	36	62				43				
35	37	36					43				
46	39	36					49				
48	39						72				
51	39						79				
52	39										
53	41										
64	41										
	43										
	43										
	45										
	45										

**Tableau IX. Nombre de bourdons mâles émergés dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en cholestérol.**

Nombre de <i>B. terrestris</i> mâles											
Pollen de saule (lot C)											
Non supplémenté						Supplémenté en cholestérol					
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 2	Bloc 3
15	20	11	9	8	7	5	11	3	3	5	3

**Tableau X. Durée de la période précédant l'apparition du premier cocon (jours) dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en cholestérol.**

Durée de la période précédant l'apparition du premier cocon de <i>B. terrestris</i> (jours)											
Pollen de saule (lot C)											
Non supplémenté						Supplémenté en cholestérol					
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 5	Bloc 6	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 2	Bloc 3
22	25	23	25	23	22	31	25	23	25	23	22

**Annexe III**  
**Paramètres mesurés sur les bourdons mâles (*Bombus terrestris*) élevés dans les colonies orphelines.**

**Tableau XI. Durée de vie (jours) des bourdons mâles élevés dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en stigmastérol.**

Durée de vie des <i>B. terrestris</i> mâles (jours)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
22	36	27	39	33	22
18	31	46	50	37	61
31	14	29	21	44	46
20	42	28	25	37	53
17	27	56	45	47	
26	19	26	28	30	
43	37	19	57	17	
37	35		38	25	
33	45		25	24	
20	51		43	45	
34	50				
46	38				
20	42				
40					
36					
34					
40					



**Tableau XII. Longueur radiale (mm) des ailes antérieures des bourdons mâles élevés dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en stigmastérol.**

Longueur radiale des ailes des <i>B. terrestris</i> mâles (mm)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
4,22	4,14	2,10	2,06	2,19	6,43
3,48	4,51	2,79	2,13	5,18	2,18
2,94	4,42	4,50	2,51	3,97	5,51
1,70	1,40	0,78	4,00	4,66	5,43
2,25	3,23	2,67	1,98	3,75	
4,61	1,69	3,25	4,58	2,19	
1,37	2,19		2,51	2,08	
2,41	2,08		0,59	5,60	
3,63	1,60		2,71	0,16	
4,63	2,18		2,49	2,91	
1,83	2,84				
0,43	2,62				
3,27	0,74				
2,56					
1,34					
3,51					
3,84					

**Tableau XIII. Durée de la période (jours) précédant l'émergence des bourdons mâles dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en stigmastérol.**

Durée de la période précédant l'émergence des <i>B. terrestris</i> mâles (jours)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
34	48	30	34	34	15
34	40	33	34	34	24
42	40	33	38	34	24
42	52	33	48	44	24
42	54	51	52	52	
50	54	54	52	56	
50	59	57	54	57	
51	59	57	54	58	
51	60		56	61	
51	61		56		
54	62		61		
54	62				
54					
56					
57					
60					
60					
60					

**Tableau XIV. Nombre de bourdons mâles élevés dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en stigmastérol.**

Nombre de <i>B. terrestris</i> mâles					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
18	12	8	11	9	4

**Tableau XV. Durée de la période (jours) précédant l'apparition du premier cocon dans les colonies orphelines (blocs) nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté ou non en stigmastérol.**

Durée de la période précédant l'apparition du premier cocon de <i>B. terrestris</i> (jours)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
27	27	21	23	25	25

### Annexe IV Appétence du $\beta$ -sitostérol.

**Tableau XVI. Quantités de pollen de colza (lot A) et de tournesol (lot B) (g), supplémentés ou non en  $\beta$ -sitostérol, ingérées par des colonies de bourdons (blocs). 5 répétitions.**

Quantités ingérées par des colonies de <i>B. terrestris</i> (g)											
Pollen de colza (lot A)						Pollen de tournesol (lot B)					
Non supplémenté			Supplémenté en $\beta$ -sitostérol			Non supplémenté			Supplémenté en $\beta$ -sitostérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
3,73	6,13	2,63	2,96	3,89	5,80	0,42	4,21	1,22	0,57	1,49	1,53
0,47	4,97	0,73	2,46	4,56	2,04	0,47	3,11	3,51	0,62	3,23	0,19
5,01	4,15	2,77	5,43	2,98	2,94	0,20	2,45	0,02	0,09	1,58	0,03
0,46	0,45	1,88	0,64	3,25	0,36	0,24	1,31	1,99	0,35	4,43	0,04
0,40	4,07	2,74	0,91	6,21	0,94	0,03	4,93	0,38	5,51	5,43	0,40
1,41	6,14	1,27	8,43	5,49	2,13	0	2,24	0,33	1,38	8,45	0,32

**Tableau XVII. Quantités de pollen de saule (lot C) (g), supplémenté ou non en  $\beta$ -sitostérol, ingérées par des colonies de bourdons (blocs).**

Quantités ingérées par des colonies de <i>B. terrestris</i> (g)							
Pollen de saule (lot C)							
Non supplémenté				Supplémenté en $\beta$ -sitostérol			
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 4
8,188	8,348	7,805	10,049	5,516	6,461	4,737	5,373
7,734	3,782	6,804	8,783	6,019	4,867	6,220	4,203
6,395	2,801	5,650	4,323	5,002	2,913	6,466	6,360
7,000	2,867	10,510	6,402	5,345	3,735	5,919	6,098
4,843	2,640	7,603	9,117	3,394	3,504	5,074	6,071
10,412	3,716	7,762	15,423	2,893	5,935	7,011	11,695
7,451	10,724	7,363		7,490	9,271	4,737	
9,859	12,713	5,926		8,705	14,999	5,695	
11,458	10,318	8,464		10,419	10,017	9,581	
		6,172				7,150	

**Annexe V**  
**Appétence du cholestérol.**

**Tableau XVIII. Quantités de pollen de saule (lot C) (g), supplémenté ou non en cholestérol, ingérées par des colonies de bourdons (blocs). 4 répétitions.**

Quantités ingérées par des colonies de <i>B. terrestris</i> (g)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en cholestérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
6,655	6,119	1,767	2,855	6,625	1,890
3,976	6,921	2,120	4,671	8,714	2,020
5,095	8,376	3,359	4,279	7,008	2,368
4,993	9,176	9,268	6,201	6,226	6,502
5,202	7,289	3,007	5,455	5,173	5,189

**Annexe VI**  
**Appétence du stigmastérol.**

**Tableau XIX. Quantités de pollen de saule (lot C) (g), supplémenté ou non en stigmastérol, ingérées par des colonies de bourdons (blocs). 5 répétitions.**

Quantités ingérées par des colonies de <i>B. terrestris</i> (g)					
Pollen de saule (lot C)					
Non supplémenté			Supplémenté en stigmastérol		
Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3	Bloc 1	Bloc 2	Bloc 3
1,608	5,862	1,120	2,665	4,681	1,233
3,441	8,170	3,077	3,875	6,299	1,299
8,508	7,071	2,615	9,217	8,194	3,044
10,476	7,311	2,784	8,487	7,408	3,455
6,789	7,223	1,322	7,932	10,099	1,702
6,816	7,387	0,755	6,160	4,776	1,505

**Annexes VII**  
**Analyses stéroliques du pollen du lot A (colza) et du lot B (tournesol).**

**Tableau XX. Composition stérolique du pollen du lot A (colza).** Total, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. N.I., composé non identifié. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur trois échantillons de pollen du lot A.

Teneurs en stérols du pollen du lot A (mg/g)			
Stérols	Echantillon de pollen 1	Echantillon de pollen 2	Echantillon de pollen 3
Cholestérol	0,206	0,296	0,163
Brassicastérol	0,935	0,949	0,867
24-Meth. Chol. + Campesterol	4,292	4,514	4,204
Stigmastérol	0,426	0,357	0,332
$\Delta$ 7-Campesterol	0,239	0,264	0,269
$\beta$ -sitostérol	0,318	0,358	0,342
Stigmastanol	0,235	0,171	0,124
$\Delta$ 5-Avénaesterol	0,747	0,670	0,668
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,023	-	-
N.I.	0,736	0,917	0,765
<b>Total (mg/g M.F.)</b>	<b>8,240</b>	<b>8,650</b>	<b>7,843</b>

**Tableau XXI. Composition stérolique du pollen du lot B (tournesol).** Total, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. N.I., composé non identifié. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur deux échantillons de pollen du lot B.

Teneurs en stérols du pollen du lot B (mg/g)		
Stérols	Echantillon de pollen 1	Echantillon de pollen 2
Cholestérol	1,126	1,110
Brassicastérol	0,168	0,224
24-Meth. Chol. + Campesterol	1,131	1,126
Stigmastérol	0,079	0,067
$\Delta$ 7-Campesterol	0,057	0,088
$\beta$ -sitostérol	1,213	0,428
Stigmastanol	0,190	0,052
$\Delta$ 5-Avénaesterol	0,083	0,130
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,220	0,281
$\Delta$ 7-Avénaesterol	0,065	0,153
N.I.	0,931	1,017

Total (mg/g M.F.)	5,292	4,714
-------------------	-------	-------



**Annexes VIII**  
**Analyse stérolique du pollen du lot C (saule).**

**Tableau XXII. Composition stérolique du pollen du lot C (saule).** Total, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. N.I., composé non identifié. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur deux échantillons de pollen du lot C.

Teneurs et pourcentages en stérols du pollen du lot C				
	Echantillon de pollen 1		Echantillon de pollen 2	
Stérols	Concentration (mg/g)	% total	Concentration (mg/g)	% total
Cholestérol	0,03	0,56	0,04	0,55
23-dehydrocholestanol	0,03	0,60	0,07	0,90
23-dehydrocampestanol	0,06	1,18	0,10	1,28
24-Meth. Chol. + Campesterol	3,35	65,50	4,90	64,54
$\beta$ -Sitostérol	0,67	12,82	0,82	10,82
$\Delta$ 5-Avénaatérol	0,24	4,66	0,87	11,50
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,03	0,62	0,05	0,61
$\Delta$ 7-Avénaatérol	0,14	2,74	0,09	1,24
N.I.	0,45	8,69	0,43	5,60
Somme	5,00		7,36	
Total (mg/g M.S.)	5,19		7,79	

**Annexes IX**  
**Analyse floristique et stérolique du pollen du lot D (Fabacées).**

**Tableau XXIII. Composition floristique du pollen du lot D (pollen de Fabacées)** (analyse effectuée par le Centre Apicole de Recherche et d'Information de Louvain-La -Neuve pour le compte de notre laboratoire).

Pollen du lot D
40,6 % Fabacées
32,5 % Astéracées
9,5 % <i>Taraxacum sp.</i>
5,8 % Brassicacées
4,6 % Rosacées
2,4 % Apiacées
1,6 % <i>Stellaria</i>
1,1 % Cistacées
1,1 % <i>Plantago</i>
0,8 % autres

**Tableau XXIV. Composition stérolique du pollen du lot D.** Total, comprend tous les pics dont les temps de rétention sont compris entre le cholestérol et la bétuline. 24-Meth. chol. + Campestérol, 24-méthylènecholestérol + campestérol. L'analyse a été effectuée sur deux échantillons de pollen du lot D.

Teneurs et pourcentages en stérols du pollen du lot D						
Stérols	Echantillon de pollen 1			Echantillon de pollen 2		
	Concentration (mg/g)	% somme	% total	Concentration (mg/g)	% somme	% total
Cholestérol	0,61	16,77	15,57	0,83	18,28	17,09
24-Meth. Chol.	1,21	33,15	30,79	1,34	29,58	27,66
Stigmastérol	0,05	1,37	1,27	0,04	0,88	0,83
Inconnu	0,50	13,70	12,72	0,79	17,42	16,29
$\beta$ -Sitostérol	0,23	6,41	5,95	0,36	7,92	7,40
$\Delta$ 5-Avéna-stérol	0,56	15,42	14,33	0,69	15,34	14,34
$\Delta$ 7-Stigmastérol	0,25	6,74	6,26	0,18	4,00	3,74
$\Delta$ 7-Avéna-stérol	0,23	6,41	5,95	0,30	6,57	6,14
Somme	3,65			4,52		
Total (mg/g M.S.)	3,93			4,84		

**Annexe X**  
**Analyse des stérols corporels de *Bombus terrestris* (L.) et *Apis mellifera* L.**

**Tableau XXV. Composition stérolique du corps de *B. terrestris* et *Apis mellifera*.** N.D., non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. Les analyses ont été effectuées sur deux échantillons pour chaque type d'insecte.

Stérols	<i>Apis mellifera</i>		<i>Bombus terrestris</i> femelle		<i>Bombus terrestris</i> mâle	
	(% stérols totaux)		(% stérols totaux)		(% stérols totaux)	
	1	2	1	2	1	2
Cholestérol	1,8	0,7	3,7	3,9	2,2	1,1
Desmostérol	N.D.	N.D.	0,5	0,3	0,2	0,6
24-Meth. Chol.	42,6	42,9	51,2	51,6	59,7	60,9
Stigmastérol	1,0	N.D.	0,3	0,2	N.D.	N.D.
$\beta$ -Sitostérol	24,7	27,7	23,7	23,5	7,6	6,8
$\Delta$ 5-Avénaatérol	21,9	23,9	19,9	20,0	29,1	30,5
$\Delta$ 7-Stigmastérol	1,1	2,2	0,2	0,2	0,2	N.D.
Autres	6,9	2,6	0,5	0,3	1,0	0,1
Teneur en stérols totaux (mg/100g M.F.)	32,6	31,0	51,8	51,5	33,9	49,6

**Annexe XI**  
**Concentrations et pourcentages en stérols des prépuces de *Bombus terrestris*.**

**Tableau XXVI. Teneurs en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule). N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.**

Teneurs en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C non supplémenté ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce en M.F.)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	7,06	N.D.	6,52	3,85	4,33	3,25
24-Meth. Chol.	802,46	334,37	385,51	575,17	379,91	489,07
Campesterol	29,58	13,002	12,68	0,31	15,39	16,66
Stigmastérol	8,14	9,18	N.D.	7,26	4,06	6,45
$\beta$ -Sitostérol	352,81	136,27	125,38	210,49	183,44	179,00
$\Delta$ 5-Avénaatérol	190,72	70,26	67,11	110,63	77,46	93,67
Total ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce) (M.F.)	1390,77	563,082	597,2	907,71	664,59	788,14

**Tableau XXVII. Pourcentages en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule). N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.**

Pourcentages en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C non supplémenté (%)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	0,49	N.D.	1,37	0,42	0,65	0,41
24-Meth. Chol.	56,17	60,19	80,96	63,27	56,99	63,58
Campesterol	2,07	2,34	2,66	0,03	2,31	2,17
Stigmastérol	0,57	1,65	N.D.	0,80	0,61	0,84
$\beta$ -Sitostérol	24,70	24,53	26,33	23,15	27,52	23,28
$\Delta$ 5-Avénaatérol	13,35	12,65	14,09	12,17	11,62	12,18

**Annexe XII**  
**Concentrations et pourcentages en stérols des prépuces de *Bombus terrestris*.**

**Tableau XXVIII. Teneurs en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté de 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol.** N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.

Teneurs en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de $\beta$ -sitostérol ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce en M.F.)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	6,90	2,83	5,38	2,49	2,74	8,77
24-Meth. Chol.	631,29	565,99	809,14	434,08	294,7	453,08
Campesterol	43,28	29,77	50,18	32,25	19,28	29,86
Stigmastérol	2,41	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1,66
$\beta$ -Sitostérol	457,03	280,85	490,77	290,45	186,48	283,54
$\Delta$ 5-Avénaatérol	158,92	106,06	176,33	96,97	62,65	95,97
Total ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce) (M.F.)	1299,83	985,57	1531,80	856,24	565,85	872,88

**Tableau XXIX. Pourcentages en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté de 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol.** N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.

Pourcentages en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de $\beta$ -sitostérol (%)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	0,55	0,28	0,38	0,30	0,49	0,96
24-Meth. Chol.	50,50	56,60	56,64	52,09	53,05	49,84
Campesterol	3,46	2,98	3,51	3,87	3,47	3,28
Stigmastérol	0,19	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,18
$\beta$ -Sitostérol	36,56	28,09	34,35	34,85	33,57	31,19
$\Delta$ 5-Avénaatérol	12,71	10,06	12,34	11,65	11,28	10,56

**Annexe XIII**  
**Concentrations et pourcentages en stérols des prépuces de *Bombus terrestris*.**

**Tableau XXX. Teneurs en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté de 0,3 % de stigmastérol.** 24-Meth. chol. + Campestérol, 24-méthylènecholestérol + campestérol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.

Teneurs en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de stigmastérol ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce en M.F.)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	7,37	7,58	4,01	8,42	7,68	4,58
24-Meth. Chol.	429,02	486,37	441,54	613,97	422,65	465,38
Campestérol	7,84	21,32	21,35	28,36	17,77	13,21
Stigmastérol	57,57	75,11	62,77	96,37	47,16	60,28
$\beta$ -Sitostérol	162,94	201,68	184,61	238,22	168,91	178,44
$\Delta$ 5-Avénaatérol	82,75	99,79	90,90	132,26	83,74	92,41
Total ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce) (M.F.)	747,49	891,85	805,18	1117,60	747,91	814,3

**Tableau XXXI. Pourcentages en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté de 0,3 % de stigmastérol.** 24-Meth. chol. + Campestérol, 24-méthylènecholestérol + campestérol. L'analyse a été effectuée sur 6 échantillons.

Pourcentages en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de stigmastérol (%)						
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Cholestérol	0,96	0,83	0,48	0,56	1	0,55
24-Meth. Chol.	55,77	53,50	52,98	55,26	54,94	55,85
Campestérol	1,02	2,35	2,56	2,55	2,31	1,59
Stigmastérol	7,48	8,26	7,53	8,67	6,13	7,23
$\beta$ -Sitostérol	21,18	22,18	22,15	21,44	21,96	21,41
$\Delta$ 5-Avénaatérol	10,76	10,98	10,91	11,90	10,89	11,16

**Annexe XIV**  
**Concentrations et pourcentages en stérols des prépuces de *Bombus terrestris*.**

**Tableau XXXII. Teneurs en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté en cholestérol.** N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 4 échantillons.

Teneurs en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de cholestérol ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce en M.F.)				
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4
Cholestérol	23,85	68,69	45,97	33,98
24-Meth. Chol.	250,70	417,12	506,91	317,69
Campesterol	11,77	12,62	18,73	13,38
Stigmastérol	2,78	3,67	10	N.D.
$\beta$ -Sitostérol	121,61	179,96	220,21	155,96
$\Delta 5$ -Avénastérol	59,26	100,52	106,91	75,10
Total ( $\mu\text{g/g}$ de prépuce) (M.F.)	469,97	782,58	908,73	596,11

**Tableau XXXIII. Pourcentages en stérols des prépuces de bourdons nourries de pollen du lot C (saule) supplémenté en cholestérol.** N.D., composé non détecté. 24-Meth. chol. + Campesterol, 24-méthylènecholestérol + campesterol. L'analyse a été effectuée sur 4 échantillons.

Pourcentages en stérols des prépuces de <i>B.terrestris</i> nourries de pollen du lot C + 0,3% de cholestérol (%)				
Stérols	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4
Cholestérol	5	8,93	5,06	5,78
24-Meth. Chol.	52,65	54,23	55,76	54
Campesterol	2,47	1,64	2,06	2,27
Stigmastérol	0,58	0,48	1,10	N.D.
$\beta$ -Sitostérol	25,54	23,39	24,22	26,51
$\Delta 5$ -Avénastérol	12,44	13,07	11,76	12,77

**Annexe XV**  
**Test sur la qualité nutritionnelle du  $\beta$ -sitostérol.**

**Tableau XXXIV. Analyse de la variance à 3 critères. Influence des pollens des lots A et B supplémentés ou pas de  $\beta$ -sitostérol sur la longueur radiale des ailes antérieures des bourdons mâles.**

\*\*\*:  $\alpha=0,001$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (pollen)	1	5,50	5,50	60,92 ***
Supplément (stérol)	1	0,11	0,11	1,18
Bloc (colonies)	3	1,56	0,52	5,75 ***
Aliment-Supplément	1	0,01	0,01	0,06
Aliment-Bloc	3	0,58	0,19	2,14
Supplément-Bloc	3	0,04	0,01	0,14
Aliment-Supplément-Bloc	3	1,22	0,41	4,50 **

**Tableau XXXV. Analyse de la variance à 3 critères. Influence des pollens des lot A et B supplémentés ou pas de  $\beta$ -sitostérol sur la durée de vie des bourdons mâles.** \*\*\*:  $\alpha=0,001$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (pollen)	1	6235,2	6235,2	38,929 ***
Supplément (stérol)	1	537,05	537,05	3,353
Bloc (colonies)	3	332,86	110,95	0,693
Aliment-Supplément	1	49,29	49,29	0,308
Aliment-Bloc	3	2227,4	742,47	4,636**
Supplément-Bloc	3	631,91	210,64	1,315
Aliment-Supplément-Bloc	3	772	257,33	1,607

**Tableau XXXVI. Analyse de la variance à 3 critères. Influence des pollens des lots A et B supplémentés ou pas de  $\beta$ -sitostérol sur la durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles.** \*\*\*:  $\alpha=0,001$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (pollen)	1	13556,82	13556,82	65,11 ***
Supplément (stérol)	1	20,61	20,61	0,10
Bloc (colonies)	3	8347,35	2782,45	13,36 ***
Aliment-Supplément	1	24,88	24,88	0,12
Aliment-Bloc	3	8981,44	2993,81	14,38 ***
Supplément-Bloc	3	2867,66	955,89	4,59**
Aliment-Supplément-Bloc	3	1115,12	371,71	1,79





**Annexe XVI**  
**Test sur la qualité nutritionnelle du cholestérol.**

**Tableau XXXVII. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de cholestérol au pollen du lot C (saule) sur la longueur radiale des ailes antérieures des bourdons mâles.**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	0,129	0,129	1,260
Bloc (colonies)	5	0,782	0,156	1,522
Interaction	5	0,090	0,018	<1

**Tableau XXXIX. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de cholestérol au pollen du lot C (saule) sur la durée de vie des bourdons mâles. \*\*\*:  $\alpha=0,001$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	528,606	528,606	7,799 **
Bloc (colonies)	5	2053,965	410,793	6,060 ***
Interaction	5	1151,252	230,250	>1

**Tableau XL. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de cholestérol au pollen du lot C (saule) sur la durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles. \*\*:  $\alpha=0,01$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	130,380	130,380	2,006
Bloc (colonies)	5	1283,547	256,709	3,949 **
Interaction	5	385,698	77,140	>1

**Annexe XVII**  
**Test sur la qualité nutritionnelle du stigmastérol.**

**Tableau XLI. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de stigmastérol au pollen du lot C (saule) sur la longueur radiale des ailes antérieures des bourdons mâles.**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	3,990	3,990	2,261
Bloc (colonie)	2	5,081	2,541	1,440
Interaction	2	10,885	5,442	>1

**Tableau XLII. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de stigmastérol au pollen du lot C (saule) sur la durée de vie des bourdons mâles.**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	272,787	272,787	2,154
Bloc (colonies)	2	175,472	87,736	0,693
Interaction	2	433,048	216,524	>1

**Tableau XLIII. Analyse de la variance à 2 critères. Influence de l'ajout de stigmastérol au pollen du lot C (saule) sur la durée de la période précédant l'émergence des bourdons mâles. \*:  $\alpha=0,05$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	534,204	534,204	6,163 *
Bloc (colonies)	2	2121,147	1060,573	12,235 **
Interaction	2	817,494	408,747	>1

**Annexe XVIII**  
**Test sur l'appétence du cholestérol.**

**Tableau XLIV. Analyse de la variance à 2 critères sur l'appétence du pollen du lot C (saule) supplémenté ou non de 0,3 % de cholestérol. \*\*\*:  $\alpha=0,001$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	2,010	2,010	0,654
Bloc (colonies)	2	58,101	29,051	9,453 ***
Interaction	2	1,112	0,556	<1

**Annexe XIX**  
**Test sur l'appétence du stigmastérol.**

**Tableau XLV. Analyse de la variance à 2 critères sur l'appétence du pollen du lot C (saule) supplémenté ou non de 0,3 % de stigmastérol. \*\*\*:  $\alpha=0,001$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	0,003	0,003	0,001
Bloc (colonies)	2	179,369	89,684	21,992 ***
Interaction	2	0,267	0,133	<1

**Annexe XX**  
**Test sur l'appétence du  $\beta$ -sitostérol.**

**Tableau XLVI. Analyse de la variance à 2 critères sur l'appétence du pollen du lot C (saule) supplémenté ou non de 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol.**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	1	25,158	24,158	3,026
Bloc (colonies)	3	11,165	3,722	0,466
Interaction	3	19,382	6,461	>1

**Tableau XLVII. Analyse de la variance à 2 critères sur l'appétence des pollens des lots A et B supplémentés ou non de 0,3 % de  $\beta$ -sitostérol. \*\*\*:  $\alpha=0,001$ ; \*\*:  $\alpha=0,01$ .**

	Degrés de liberté	Somme des carrés des écarts	Carrés moyens	F
Aliment (stérol)	3	37,33	12,44	4,99 **
Bloc (colonies)	2	88,52	44,26	13,78 ***
Interaction	6	14,95	2,49	<1