

UNIVERSITE DE MONS
FACULTE DES SCIENCES
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Impact du réchauffement climatique sur
les récompenses florales d'*Impatiens
glandulifera* (Balsaminaceae) et le
comportement de visite de *Bombus terrestris* (L.)
(Hymenoptera, Apidae)**

Promoteur : Dr.Ir.D. Michez

Mémoire de fin d'Etudes

présenté par **Jérôme Canei**

En vue de l'obtention du grade de **Maître en
Biologie des Organismes et Ecologie**

Année académique 2013-2014

« La connaissance s'acquiert
par l'expérience, tout le reste
n'est que de l'information. »
Albert Einstein

UNIVERSITE DE MONS
FACULTE DES SCIENCES
LABORATOIRE DE ZOOLOGIE

**Impact du réchauffement climatique sur
les récompenses florales d'*Impatiens
glandulifera* (Balsaminaceae) et le
comportement de visite de *Bombus terrestris* (L.)
(Hymenoptera, Apidae)**

Promoteur : Dr.Ir.D. Michez

Mémoire de fin d'Etudes

présenté par **Jérôme Canei**

En vue de l'obtention du grade de **Maître en
Biologie des Organismes et Ecologie**

Année académique 2013-2014

Résumé

Les abeilles (Hymenoptera, Apoidea) font partie des pollinisateurs les plus importants des plantes à fleurs. Cependant, un déclin mondial des espèces d'abeilles est actuellement constaté. De multiples causes sont à l'origine de ce déclin. La fragmentation et la perte des habitats, l'utilisation des pesticides et les maladies exotiques font partie des causes évoquées pour expliquer ce déclin. Un autre facteur majeur pourrait être le réchauffement climatique. Ce phénomène largement reconnu et étudié constitue un facteur dont l'impact sur les pollinisateurs est encore peu connu. L'impact éventuel du réchauffement climatique, en considérant comme facteur principal l'augmentation significative des températures, est ici investigué.

Une relation plante-pollinisateur spécifique, impliquant les espèces *Bombus terrestris* et *Impatiens glandulifera* a été étudiée. Des individus de cette espèce végétale ont été placés en phytotrons sous 3 températures différentes (21°C-24°C-27°C). Suite à cette exposition, des mesures morphologiques ont été réalisées. Les récompenses florales que sont le pollen et le nectar ont également été prélevées. Le nectar a été analysé au niveau des carbohydrates, d'un point de vue qualitatif et quantitatif. La qualité du pollen en termes de polypeptides et d'acides aminés a été investiguée. Des ouvrières de *Bombus terrestris* ont été mise en présence de ces plantes aux 3 températures mentionnées plus haut. Leur comportement de visite a été étudié en termes de taux et de temps de visite. Les résultats obtenus montrent que *I. glandulifera* présente des récompenses florales de moindre qualité suite à un mois d'exposition à 27°C. La teneur en polypeptides et en acides aminés du pollen est significativement inférieure par rapport aux autres groupes considérés et le profil en carbohydrates est également affecté par cette température élevée. Le taux de visite des ouvrières de *B. terrestris* augmente globalement en fonction de la température. Le temps de visite diminue quant à lui lorsque la température ambiante est plus élevée. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons constater que la température exerce un effet négatif sur la qualité des récompenses florales d'*I. glandulifera*, et est liée à un changement de comportement chez *B. terrestris*. Ce changement de comportement est dû à un effet direct de la température et/ou un effet indirect de récompenses florales de moindre qualité. Sur base de nos résultats, le réchauffement climatique pourrait donc avoir un impact négatif sur le maintien des populations de bourdons par une diminution de la qualité des récompenses florales.

Mots-clés : réchauffement climatique - pollen – nectar – bourdon – éthologie

Remerciements

Je tiens par ces quelques lignes à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Je remercie le Professeur Pierre RASMONT de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Zoologie. Au cours de toutes ces années d'études, il m'a transmis sa passion contagieuse pour la zoologie et l'écologie.

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

Je remercie le Professeur Anne-Laure JACQUEMART de l'Université Catholique de Louvain de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire (Ecologie Végétale, Génétique, reproductions, populations, POPS) et de m'avoir permis de réaliser une partie importante du présent travail. J'adresse tous mes remerciements au Professeur Philippe GROSJEAN pour ses conseils avisés concernant les analyses statistiques.

Je suis très reconnaissant envers le Professeur Pierre RASMONT, du service de Zoologie de l'Université de Mons, le Professeur Philippe GROSJEAN du Service d'Ecologie Numérique des Milieux Aquatiques, ainsi que le Professeur Anne-Laure JACQUEMART de l'Université Catholique de Louvain (Faculté d'ingénierie biologique, agronomique et environnementale) d'avoir accepté de participer à ce jury.

Que soit ici remerciés tous les membres du laboratoire de Zoologie pour leur écoute et leur aide. Je remercie tout particulièrement Monsieur Dimitri EVRARD pour sa disponibilité à toute épreuve et son aide précieuse tout au long de ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Maryse VANDERPLANCK. Un tout grand merci pour son aide indispensable durant la réalisation de ce travail. Je la remercie pour ses précieux conseils, son aide quotidienne et son soutien permanent. Je tiens à remercier tout particulièrement Nathalie ROGER pour sa disponibilité, son aide indispensable et son humour ravageur.

Je remercie le service de Protéomie et Microbiologie du Professeur Ruddy WATTIEZ de m'avoir accueilli pour la réalisation de mes analyses polypeptidiques. Je remercie

également le Professeur Bernard WATHELET du service de Chimie biologique industrielle de la Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux pour les analyses d'acides aminés. Je tiens à adresser tous mes remerciements au Docteur Séverine Suchail de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UAPV Abeilles et Environnement, INRA, Avignon) pour la réalisation des analyses de carbohydrates.

Un tout grand merci à tous mes amis de promotion, Syrphe, Louc, Mich et Pitch pour ces 5 années passées ensemble et pour tous les moments mémorables partagés. Ces années d'études resteront gravées à jamais. Je tiens également à remercier Manu et Pilou pour leur bonne humeur quotidienne et leur humour hétéroclite.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements et leur soutien sans faille.

Table des matières

1. Introduction.....	7
1.1. Les réseaux de pollinisation.....	7
1.2. Déclin des abeilles et perturbation du réseau de pollinisation.....	8
1.3. Réchauffement climatique	10
1.3.1. Généralités	10
1.3.2. Impact sur la faune pollinisatrice.....	12
1.3.3. Impact sur les plantes.....	15
1.3.3.1. Impacts généraux.....	15
1.3.3.2. Impact sur la chimie du nectar et du pollen.....	17
1.3.4. Impact sur les réseaux de pollinisation.....	18
1.4. Objectifs.....	19
1.5. Modèles biologiques.....	20
1.5.1. <i>Bombus terrestris</i>	20
1.5.2. <i>Impatiens glandulifera</i>	21
2. Matériel et méthodes.....	24
2.1. Dispositifs expérimentaux.....	24
2.1.1. Phytotrons.....	24
2.1.2. Conditions d'expérimentation.....	24
2.2. Mesures morphologiques et analyses des récompenses florales.....	25
2.2.1. Mesures morphologiques.....	25
2.2.2. Prélèvement du pollen.....	26
2.2.3. Analyse des polypeptides du pollen.....	26
2.2.4. Analyse des acides aminés totaux du pollen.....	28
2.2.5. Prélèvement du nectar.....	29
2.2.6. Mesure de la concentration en saccharose du nectar.....	30
2.2.7. Analyse qualitative et quantitative des polysaccharides du nectar.....	31
2.3. Etudes du comportement.....	32
2.4. Analyses statistiques.....	36
2.4.1. Analyse de la variance.....	36
2.4.2. Analyses multivariées.....	37
2.4.2.1. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS)....	37

2.4.2.2. Analyse multivariée de la variance par test de permutation...	38
2.4.2.3. Analyse des composés indicateurs.....	38
2.4.2.4. ANOVA à deux facteurs croisés.....	39
3. Résultats.....	40
3.1. Impact de la température sur la morphologie d' <i>Impatiens glandulifera</i>	40
3.2. Impact de la température sur les ressources florales.....	41
3.2.1. Nectar.....	41
3.2.1.1. Volume de nectar.....	41
3.2.1.2. Concentration en saccharose.....	41
3.2.1.3. Profil en carbohydrates.....	42
3.2.2. Pollen.....	46
3.2.2.1. Teneur en polypeptides.....	46
3.2.2.2. Teneur en acides aminés.....	46
3.3. Impact sur le comportement de récolte de <i>Bombus terrestris</i>	50
4. Discussion.....	55
4.1. Impact de la température sur la morphologie d' <i>Impatiens glandulifera</i>	55
4.2. Impact de la température sur les ressources florales d' <i>Impatiens glandulifera</i>	56
4.2.1. Le nectar.....	56
4.2.2. Le pollen.....	57
4.3. Impact de la température sur le comportement de visite de <i>Bombus</i> <i>terrestris</i>	58
4.4. Impact de la température sur la relation <i>Bombus terrestris</i> - <i>Impatiens</i> <i>glandulifera</i>	59
4.5. Impact du réchauffement climatique sur la conservation des interactions plantes – pollinisateurs.....	61
5. Conclusion.....	62
6. Perspectives.....	63
7. Bibliographie.....	64

1. Introduction

1.1. Les réseaux de pollinisation

Les liens existants entre une communauté végétale composée de plantes appartenant à des espèces diverses et un ensemble donné d'insectes pollinisateurs, forme ce que l'on appelle un réseau de pollinisation (Fig.1). Ce réseau permettant d'assurer une pollinisation indispensable pour beaucoup d'espèces de plantes à fleurs, il est d'une importance primordiale pour l'être humain. En effet, plus de 75 % des cultures destinées à l'alimentation humaine nécessitent une telle pollinisation (Klein *et al.*, 2007), essentiellement grâce aux abeilles. De plus, 80 % des espèces d'angiospermes requièrent la visite de tels pollinisateurs pour assurer leur reproduction (Ollerton *et al.*, 2011). D'autre part, ces insectes sont liés de façon tout aussi primordiale aux communautés végétales, par l'apport alimentaire indispensable que celles-ci leurs fournissent. Ceci est particulièrement vrai pour les Hyménoptères apoïdes (abeilles et bourdons) qui se nourrissent exclusivement de ressources florales (nectar et pollen) (Goulson, 2010). Il est à noter que ces relations abeilles pollinisatrices-plantes visitées, peuvent être plus ou moins spécialisées selon les modèles biologiques étudiés. En effet, la catégorie d'abeilles dites oligolectiques sont spécialisées sur un nombre restreint d'espèces végétales. A contrario, les espèces dites polylectiques visitent un très grand nombre de plantes pouvant appartenir à un grand nombre de familles végétales (Cane & Sipes, 2006).

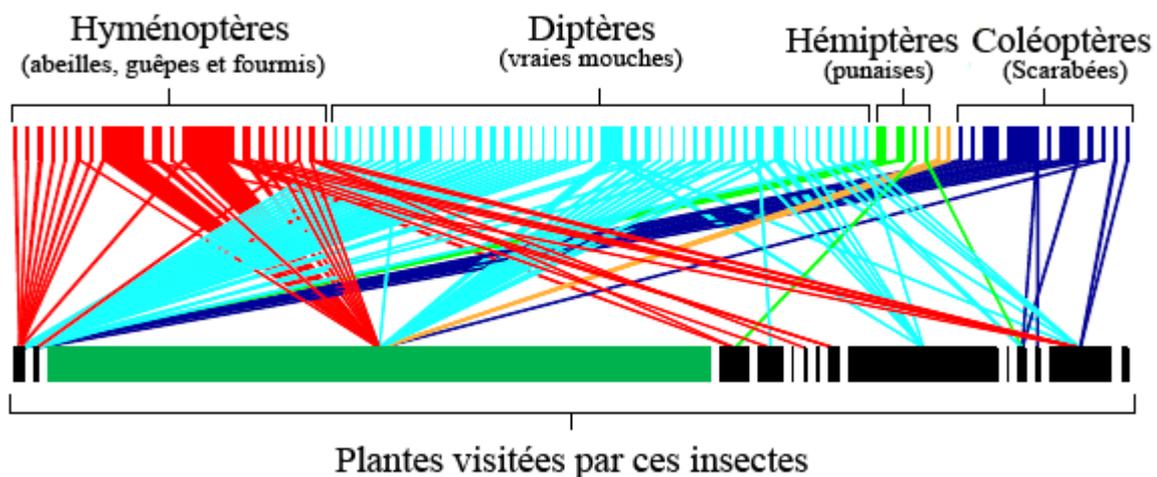


Figure 1 : Réseau de pollinisation

(<http://www.bristol.ac.uk/biology/research/ecological/community/pollinators/question1/>)

1.2. Déclin des abeilles et perturbation du réseau de pollinisation

Les réseaux de pollinisation subissent actuellement, et depuis une période plus ou moins longue selon les facteurs, des perturbations importantes (Williams & Osborne, 2009). Les insectes pollinisateurs les plus indispensables faisant partie de la super-famille des Apoïdea, nombre d'études se concentrent sur ce groupe (cf. Potts *et al.*, 2010). En Belgique la situation des Apoïdes est assez mitigée (Fig.2).

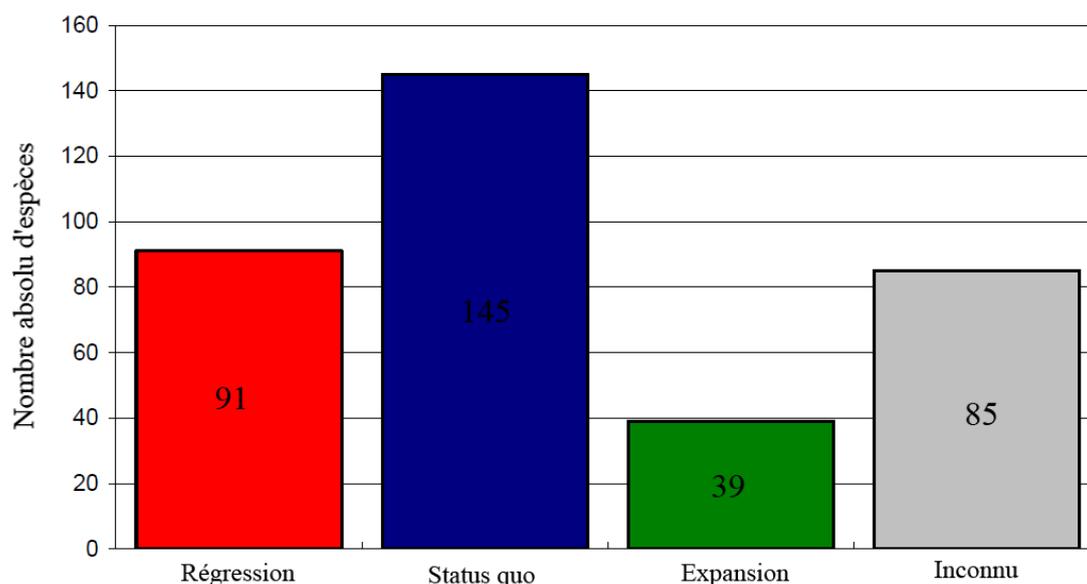


Figure 2 : Situation des Apoïdes de Belgique (Rasmont *et al.*, 2005)

Sur les 360 espèces que l'on peut rencontrer sur notre territoire, 91 sont en situation de déclin. Cependant la plupart sont stables (145), certaines étant même en expansion (39). Environ la moitié des trente espèces de bourdons de Belgique est en déclin (Rasmont *et al.*, 2005). Les causes de ces déclins sont multiples et variées, impliquant différents facteurs pouvant agir en synergie. Leurs conséquences étant par ailleurs mieux étudiées en Europe et en Amérique du Nord.

Une des causes les mieux étudiées, concerne les perturbations d'origine anthropique provoquées par les changements dans les pratiques agricoles depuis la moitié du 20^{ème} siècle. En effet, l'exploitation intensive des cultures dont l'utilisation de machines agricoles, a provoqué une perte ou une fragmentation importante d'habitats autrefois disponibles (Ricketts *et al.*, 2008 ; Winfree *et al.*, 2009). Cette agriculture moderne a mené entre autres à la perte

des vergers, des haies, à l'agrandissement de la taille des champs cultivés et à l'utilisation intensive d'engrais chimiques (Williams, 1986). De plus, un changement dans le type de plantes cultivées s'est ajouté à ces transformations en abandonnant par exemple la culture tréflière (Rasmont, 1988). Ces pratiques ont donc, de manière claire, provoqué une perte de l'abondance et de la diversité des insectes pollinisateurs par la perte de ressources alimentaires. Le remodelage du paysage et de la végétation par l'agriculture industrielle a mené par ailleurs à la perte de sites de nidification de qualité (Osborne *et al.*, 2008).

D'autres facteurs liés à l'intensification de l'agriculture, comme l'utilisation abondante des pesticides sont également en cause (Kevan *et al.*, 1997). Ces produits destinés à augmenter les rendements agricoles en éliminant mauvaises herbes, champignons et insectes indésirables ont un effet délétère sur les pollinisateurs. Il est à noter que les empoisonnements aigus se limitent à priori à des phénomènes locaux (Rasmont *et al.*, 2005). Les dégâts causés par les insecticides sur les populations domestiques d'abeilles mellifères sont probablement tout aussi importants sur les populations d'abeilles sauvages (Williams & Osborne, 2009). D'autres catégories de produits comme les herbicides posent problème en affectant également les réseaux de pollinisation. Ils provoquent assurément une perte de la diversité et de l'abondance de certaines espèces de plantes au niveau des terres agricoles. Les fauchages fréquents viennent se coupler à ce problème. (Williams & Osborne, 2009).

Les effets négatifs de l'agriculture intensive, se trouvent confirmés lorsque l'on compare les populations d'abeilles présentes au niveau de champ cultivés biologiquement. L'agriculture biologique, excluant l'utilisation d'engrais synthétiques et de pesticides, a déjà montré une abondance et une diversité en abeilles plus importante par comparaison aux champs agro-industriels (Holzschuh *et al.*, 2008).

La perturbation des réseaux de pollinisation trouve également sa source dans l'introduction et le transport, volontaire ou non, d'organismes exotiques. L'acarien *Varroa destructor* fait partie des espèces causant le plus de problèmes dans les populations d'abeilles mellifères domestiques (Kraus & Page, 1995). Cette espèce d'origine asiatique s'est par ailleurs répandue à travers l'Europe et l'Amérique du Nord. Un autre facteur qui pourrait causer des dégâts sur la faune pollinisatrice impliquée dans un réseau, est l'introduction d'espèces exotiques envahissantes de pollinisateur. Certaines études montreraient en effet un impact négatif sur les populations d'espèces indigènes de bourdons, comme c'est le cas au Japon (Inoue *et al.*, 2008).

En plus des espèces invasives animales déjà citées, les plantes exotiques envahissantes constituent un facteur perturbateur relativement bien étudié. Son impact sur les interactions plantes-pollinisateurs affecte autant les communautés végétales que les guildes de pollinisateurs. Les effets provoqués peuvent être négatifs mais également, neutres, voire positifs (Bjerknes *et al.*, 2007). Par exemple, ces espèces exotiques envahissantes peuvent avoir un effet néfaste sur la reproduction des plantes natives, en monopolisant les pollinisateurs présents sur un site donné. Chittka & Schurkens (2001) ont ainsi démontré que les grandes fleurs voyantes et odorantes d'*Impatiens glandulifera* pouvaient fortement attirer les pollinisateurs habituels des espèces natives, causant dès lors un changement des choix floraux et une diminution du nombre de graines formées chez les plantes natives. Ces changements de plantes dominantes dans le paysage peuvent localement et en particulier, affecter les pollinisateurs spécialistes qui voient leurs ressources décliner (Biesmeijer *et al.*, 2006).

Une dernière cause importante qui peut être évoquée concerne l'effet négatif supposé du réchauffement climatique. Le présent travail étant ciblé plus particulièrement sur cette problématique, ce phénomène sera donc décrit en détails ci-après.

1.3. Réchauffement climatique

1.3.1. Généralités

Le réchauffement climatique se définit comme étant la variation statistiquement significative de l'état moyen du climat ou de sa variabilité, persistant depuis une période de plusieurs décennies ou plus (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012). Les causes de ce phénomène maintenant incontesté se trouvent probablement à la fois dans les processus naturels et dans les changements anthropogéniques en rapport avec l'atmosphère et la composition des terres (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012). Parmi les causes naturelles qui peuvent être évoquées, l'activité solaire en est une importante. L'activité solaire est liée de manière claire au climat, comme on peut le voir par l'étude climatique du dernier millénaire. Une activité solaire élevée durant le haut Moyen-âge est corrélée au réchauffement des températures de nos régions durant cette période, tandis que le petit âge glaciaire est lié à une faible activité solaire (surtout entre 1645 et 1715) (Keller, 2004). Ce forçage solaire direct peut expliquer les changements climatiques observés dans l'hémisphère nord depuis 1000 ans et ce jusqu'au début du 20^{ème} siècle (Fig. 3).

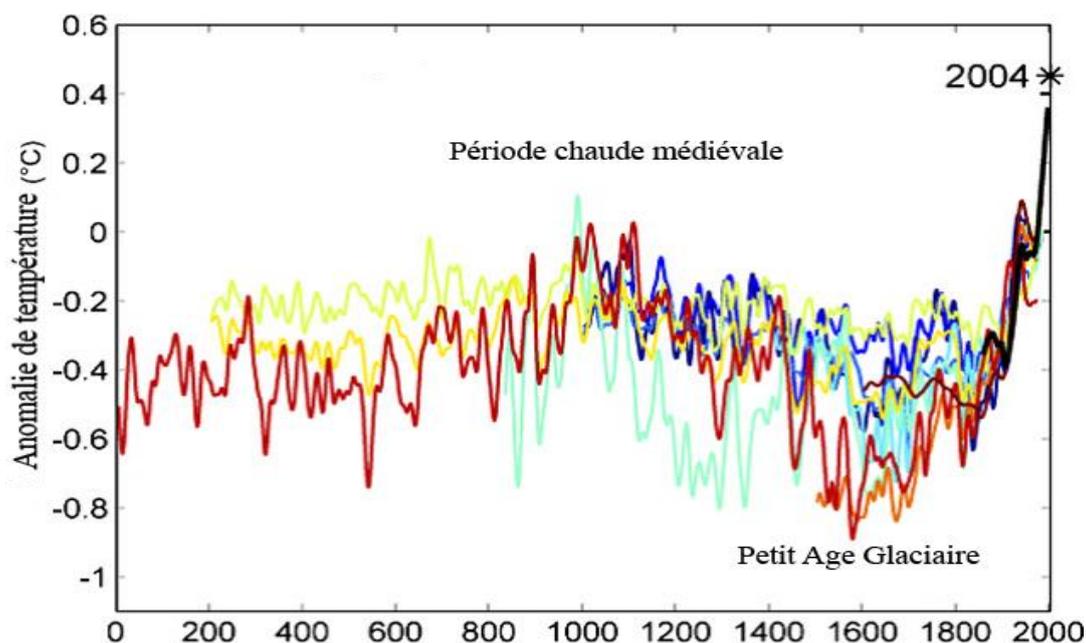


Figure 3 : Reconstruction des températures des deux derniers millénaires par divers indicateurs climatiques indirects (Feynman, 2007).

Durant le 20^{ème} siècle et surtout après 1975, l'activité solaire n'explique plus que partiellement, indirectement, le réchauffement climatique (Keller, 2004). Les gaz à effets de serre constituent la cause anthropique majeure du réchauffement climatique (Fig.4). Entre l'an 1750 et l'an 2000, le taux de dioxyde de carbone dans l'atmosphère s'est accru de 31% (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012). De la même manière d'autres gaz aux effets encore plus délétères comme le méthane (lié à l'agriculture) et le protoxyde d'azote, ont augmenté respectivement de 151% et 17% durant la même période (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012).

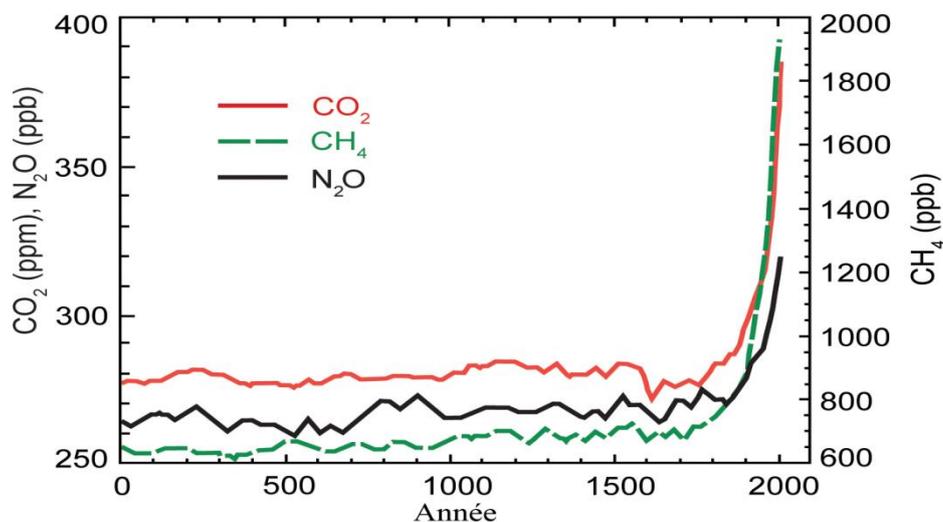


Figure 4 : Evolution des concentrations en dioxyde de carbone, méthane et protoxyde d'azote sur les deux derniers millénaires (<http://www.globalchange.gov/HighResImages/1-Global-pg-14.jpg>)

En attendant des études futures en vue de préciser les mécanismes mis en causes et leurs détails, l'impact du réchauffement global est déjà largement documenté. Les effets sur la biosphère concernent tous les composants biotiques et abiotiques tels que la qualité de l'air, la qualité de l'eau potable, la distribution des espèces animales et végétales, l'expansion des vecteurs de maladies infectieuses, ou encore la santé humaine par l'augmentation des inondations et des stress de chaleur (VijayaVenkataRaman *et al.*, 2012). Thomas *et al.* (2004) prédisent par exemple que jusqu'à 37 % des espèces animales et végétales pourraient disparaître dans les cinquante prochaines années à cause du réchauffement climatique. Des études menées au niveau d'une ou plusieurs espèces en particulier, en étudiant l'effet d'une ou plusieurs variables climatiques basiques, comme la température, semble être la clé pour quantifier l'impact du réchauffement global à plus large échelle (Eyre *et al.*, 2005). L'étude récente de Buchhloz *et al.* (2013) en constitue un bel exemple. Dans cette étude considérant comme modèles biologiques les Orthoptères, les Carabidae et les Aranae, des résultats contrastés ont été obtenus quant à leurs réponses aux variables climatiques utilisées (irrigation contrôlée et sécheresse provoquée). Certaines espèces de Carabidae étaient par exemple plus importantes en nombre d'individus lorsque la sécheresse était accrue alors que d'autres l'étaient également lorsque l'humidité était accrue. D'un autre côté il est apparu que le nombre d'individus orthoptères et araignées était plus élevé lorsque la sécheresse était plus importante. A contrario, la diversité en espèces de Carabidae et d'Aranae était significativement plus grande lorsque l'humidité du sol était plus importante. Tous ces résultats montrent par ailleurs la difficulté d'extrapoler des résultats expérimentaux à une échelle globale sans avoir au préalable considéré les réponses propres à chaque espèce.

1.3.2. Impact sur la faune pollinisatrice

Le réchauffement climatique a une influence incontestable sur la biosphère à travers les paramètres climatiques. Ceux-ci sont déjà évoqués par Williams (1988) comme étant probablement un sujet d'intérêt plus important que la simple étude de l'aire de répartition géographique des bourdons. Le déclin des populations de bourdons en Europe (cf. Grande-Bretagne), du moins pour les espèces ayant des préférences climatiques plus étroites, pourrait donc s'expliquer par ce phénomène global (Williams *et al.*, 2007).

De plus, un lien entre les préférences climatiques d'une espèce et la disponibilité des ressources florales a été mis en évidence. Des espèces de bourdons éloignées de leur optimum climatique peuvent s'installer dans des habitats fragmentés mais présentant des espèces végétales abondantes ou plus rentables (Williams *et al.*, 2007). Des espèces qui ont donc des préférences climatiques plus étroites, comme les espèces *Bombus distinguendus* et *Bombus sylvarum*, ont une niche climatique moins large que des espèces comme *Bombus pascuorum*. Ceci implique par conséquent que des ressources végétales supplémentaires permettent à ces bourdons de s'installer dans des zones où leurs exigences climatiques sont moins rencontrées (Williams *et al.*, 2007). Ces espèces plus spécialisées sont justement celles subissant un déclin net. Elles présentent un resserrement vers le centre de leur aire de répartition géographique, en tout cas en ce qui concerne la Grande-Bretagne.

Le réchauffement climatique pourrait donc perturber la répartition des bourdons en jouant sur un déplacement des optimums climatiques propres à chaque espèce, mais l'application généralisée de cette hypothèse a été réfutée (Williams, 1986,1989). En effet, en prenant le cas britannique, l'on s'aperçoit que des espèces en déclin se réfugient vers le nord pour l'une (*B. distinguendus*) et vers le sud pour l'autre (*B. sylvarum*) ; ce qui contredit l'effet présumé d'un décalage des isothermes vers le Nord. Néanmoins le réchauffement global pourrait agir sur ces distributions par des extrêmes de températures, affectant à la fois les espèces de bourdons adaptées à des températures basses et celles adaptées à de plus fortes chaleurs (Williams *et al.*, 2007). Il est à noter par ailleurs que l'importance des effets du réchauffement climatique sur la faune pollinisatrice pourrait être différente selon les régions (Williams *et al.*, 2007 ; Williams & Osborne, 2009). Cependant, l'expansion vers des zones nordiques, comme l'Ecosse, d'espèces de bourdons tels que *Bombus terrestris* et *Bombus lapidarius*, pourraient être dues au réchauffement climatique (Williams *et al.*, 2007). La distribution des espèces d'abeilles serait également affectée, comme le suggèrent certaines études de modélisation sur la surface future des habitats disponibles pour ces insectes (Giannini *et al.*, 2012). Westhus *et al.* (2013) ont en effet démontré que lorsque des ouvrières de *Bombus terrestris* étaient soumises à une augmentation de température du couvain (et non de l'air ambiant), un comportement de ventilation différent était observé. En effet, les ouvrières de cette espèce modulaient leur réponse en fonction des expériences passées (le seuil de température au dessus duquel les ouvrières ventilent plus dépendant des températures auxquelles elles ont été soumises auparavant). Ceci nous indique que la température est un facteur primordial dans la vie d'une colonie.

De la même manière, les populations de bourdons se trouvent affectées par les extrêmes de température imposés par le réchauffement global. Les espèces de bourdons des Pyrénées-Orientales ont montré une corrélation claire entre des faibles abondances d'individus et des conditions de sécheresse durant l'année précédant la récolte, donc durant la phase solitaire (Iserbyt & Rasmont, 2012). De plus, l'effet des canicules et vagues de chaleur sur le continent européen a pour corolaire une diminution drastique de la faune de bourdons et ce sur diverses régions (Rasmont & Iserbyt, 2012).

L'étude de l'impact du réchauffement climatique sur la phénologie des espèces d'abeilles et de bourdons constitue également un aspect important à prendre en compte. Sgolastra *et al.* (2011) ont par exemple montré l'impact des températures hivernales chez *Osmia lignaria*. Lorsque cette espèce était soumise expérimentalement à un hiver tardif, les adultes hivernant présentaient une perte de poids plus importante que leurs consœurs soumises à des conditions différentes. De la même manière la survie des abeilles après cette période d'hivernation raccourcie (effectuée à l'âge adulte chez cette espèce) était significativement plus petite. Une perte de graisse plus importante et une perte en lipides deux fois plus grande ont également été constatées. Cette étude démontre l'impact probable d'un allongement de la période de croissance, tel que prédit par l'IPPC (2007) chez une espèce d'abeille solitaire. Une extension globale de deux semaines de la période de croissance, animaux et plantes considérés, étant prédite pour les cinquante prochaines années. Des périodes de pré-hivernage plus longues pourraient donc affecter la survie hivernale, particulièrement chez les espèces réclamant une période de refroidissement pour l'entrée en diapause hivernale (Bale & Hayward, 2010). De plus, les facteurs climatiques (en particulier température et humidité) semblent avoir un impact non négligeable sur le comportement de récolte des abeilles (Peat & Goulson, 2005). Il a par exemple été démontré qu'une humidité relative importante était corrélée à une collecte de nectar accrue chez les ouvrières de *Bombus terrestris* alors que le pollen était lui collecté préférentiellement les jours secs et venteux.

1.3.3. Impact sur les plantes

1.3.3.1. Impacts généraux

Les conséquences du réchauffement climatique sur la flore sont assez bien documentées. Une première conséquence majeure du réchauffement climatique concerne le renforcement de l'expansion de certaines espèces exotiques envahissantes. Il est par exemple prévu que l'espèce exotique envahissante *Robinia pseudoacacia* voit son aire de répartition fortement augmenter d'ici plusieurs décennies, la menant dans des zones menacées et protégées, du moins en Europe centrale (Kleinbauer *et al.*, 2010). De la même manière les espèces natives de plantes qui voient leur aire de distribution se déplacer pour faire face aux changements climatiques régionaux pourraient se retrouver bloquées à cause d'une destruction et d'une fragmentation des habitats (Brodie *et al.*, 2012).

La phénologie des espèces végétales est également une caractéristique importante sur laquelle le réchauffement climatique pourrait exercer une influence. Par exemple, Primack *et al.* (2009) ont démontré l'influence incontestable du réchauffement climatique sur la période de floraison du cerisier du Japon (*Prunus jamasakura*), suivie durant 1200 ans. Les résultats de cette étude montrent que la date de floraison durant les années 80 et le début des années 90, n'a jamais été si précoce. Durant la période allant de 1971 à l'an 2000, les fleurs ont fleuri en moyenne 7 jours plus tôt en comparaison avec la période précédente de plus de 1200 ans. Il est à noter qu'un tiers de cette valeur semble avoir été causée par le réchauffement urbain et non par le réchauffement climatique à l'échelle régionale du Japon. Une étude récapitulative de Richardson *et al.* (2013) détaille par ailleurs les impacts probables du réchauffement climatique sur la phénologie végétale et ceci biome par biome. Les zones tempérées eurasiennes et nord-américaines semblent par exemple subir une augmentation de la période de croissance (à la fois par l'arrivée précoce du printemps et une sénescence automnale retardée) de 2,1 à 4,2 jours par décennie. Les milieux méditerranéens semblent quant à eux devoir subir à l'avenir un commencement plus précoce de la croissance hivernale-printanière, compensé à un certain degré par une période de sécheresse estivale plus précoce et plus longue.

Un autre impact important et relativement bien documenté concerne la perturbation de l'anatomie et de la physiologie végétale par de hautes températures, et en particulier des conséquences possibles sur les processus reproductifs. La réponse à ces conditions dépend bien évidemment de chaque espèce, mais ces stress thermiques affectent à la fois les fonctions

mâles et femelles impliquées dans la reproduction (Hedhly *et al.*, 2008). Lors de la formation des gamétophytes, des températures hautes peuvent conduire à des anomalies chez les gamétophytes mâles et à un retard des gamétophytes femelles. De plus, ces conditions de température peuvent mener à la formation de pollen de viabilité faible ainsi qu'à une perte de synchronisation lors de la fertilisation. Une rupture précoce de la dormance et une floraison anticipée peuvent également s'observer (Nava *et al.*, 2009).

Concernant la phase mâle, ces températures affectent également le développement des grains de pollen lorsqu'elles sont appliquées avant l'anthèse, ce qui a pour résultat une stérilité du pollen (Erickson & Markhart, 2002). Une autre étude montre également que les semaines précédant l'anthèse seraient les plus sensibles, des hautes températures à cette période menant à des changements développementaux dans les anthères, à des irrégularités dans l'épiderme et de nouveau à une formation faible de pollen (Sato *et al.*, 2002). Toujours du point de vue mâle, la croissance du tube pollinique peut être accrue lors de l'exposition à de fortes températures (Hedhly *et al.*, 2004). De plus, toujours au niveau des tubes polliniques, ceux-ci peuvent se retrouver bloqués entre le stigmate et le sac embryonnaire ou encore avoir une réaction d'incompatibilité accrue (Selak *et al.*, 2013).

De la même manière, ces températures élevées peuvent mener à une inhibition de la fertilisation ou à un développement précoce du stock de fruits lorsqu'elles sont appliquées après la pollinisation (Erickson & Markhart, 2002). Il faut également remarquer que même sous des conditions favorables, le stock de fruits diminue de manière naturelle ; élément qui doit donc être pris en compte lorsque des températures élevées sont à l'oeuvre (Sato *et al.*, 2002).

Il faut remarquer que d'autres facteurs impliqués dans le réchauffement global, comme le CO₂, peuvent agir en synergie avec l'augmentation des températures. De nombreuses études multifactorielles nous donnent des indications sur les effets potentiels de ces combinaisons de facteurs perturbateurs. Il a par exemple été démontré qu'un taux de dioxyde de carbone élevé pouvait accroître de manière claire la photosynthèse et le nombre de graines mais que ces effets bénéfiques ne sont en rien compensés par les effets néfastes des hautes températures sur les récoltes et la reproduction sexuée (Prasad *et al.*, 2002). D'autres études ont également démontré l'effet néfaste de facteurs devant à priori être en augmentation dans le futur, comme la quantité d'UVB (Koti *et al.*, 2007). Hoover *et al.* (2012) ont quant à eux

analysé l'influence combinée des hautes températures, d'un taux de CO₂ élevé et d'un dépôt d'azote accru. Ils ont démontré que la combinaison de ces trois facteurs pouvait affecter de manière non additive la morphologie florale, la phénologie et les ratios mâle/femelle pour les fleurs.

1.3.3.2. Impact sur la chimie du nectar et du pollen

D'après Hoover *et al.* (2012) la chimie du nectar (en considérant ici les sucres et acides aminés), se trouvait modifiée par des différences au niveau de la concentration de ses composés. L'impact combiné du CO₂ et de l'azote résulte en un changement dans le ratio des molécules présentes dans le nectar, la quantité de saccharose devenant moindre par rapport aux autres sucres, glucose et fructose (Hoover *et al.*, 2012). Chez l'espèce *Trifolium repens* il a été démontré que des hautes températures nocturnes mènent à une diminution du pourcentage de saccharose présent dans le nectar, de nouveau en favorisant le glucose et le fructose (Jakobsen & Kristjansson, 1994).

De plus une concentration en amidon amoindrie dans les grains de pollen, suite à une exposition à des chaleurs élevées peu avant l'anthèse, est possible (Firon *et al.*, 2006). De manière identique la concentration totale en sucres dans le pollen mature peut être amoindrie. On peut remarquer que d'autres études ont montré que la concentration en saccharose du pollen augmentait sous les mêmes conditions, avec cependant des liens probables avec la concentration de CO₂ dans l'air (Aloni *et al.*, 2001). La concentration en amidon était également amoindrie, une diminution du métabolisme expliquant peut être tous ces résultats.

D'autres molécules importantes pourraient être perturbées par les effets du réchauffement global comme par exemple les composés organiques volatiles, molécules ayant un rôle dans l'attraction des pollinisateurs (Farré-Armengol *et al.*, 2012). L'altération des composés volatiles émis pourraient également affecter leurs fonctions physiologiques et écologiques (comme la communication plante à plante grâce à certains terpénoïdes) (Yuan *et al.*, 2009).

Enfin, en ce qui concerne la qualité du pollen en termes de protéines et d'acides aminés, certaines études ont déjà démontré l'effet néfaste que peuvent avoir des températures élevées sur ces molécules. Des températures élevées appliquées de manière prolongée peuvent en effet mener à une concentration amoindrie en protéines solubles (Tang *et al.*, 2007). Des

constatations similaires ont par ailleurs été établies pour un acide aminé, la proline (Tang *et al.*, 2007 ; Mutters *et al.*, 1989).

1.3.4. Impact sur les réseaux de pollinisation

L'idée selon laquelle le réchauffement climatique pourrait affecter les relations entre espèces et plus particulièrement celles impliquées dans un réseau de pollinisation n'est pas neuve. Des études ont montré que ce phénomène peut mener à un raccourcissement de la période durant laquelle les relations plantes-pollinisateurs ont lieu (Memmott *et al.*, 2010). Il pourrait dès lors y avoir un effet négatif sur les services à la pollinisation fournis par des acteurs importants, comme par exemple les bourdons. Des augmentations de température dues à ce réchauffement, décalent linéairement dans le temps les dates d'apparition des pollinisateurs et la date de floraison des plantes pollinisées (Hegland *et al.*, 2009). Ce qui signifie qu'il y aurait, de manière générale, une réponse parallèle et équivalente parmi les espèces impliquées, bien que des différences pour chaque espèce de plante ou de pollinisateur soient attendues (Bartomeus *et al.*, 2011).

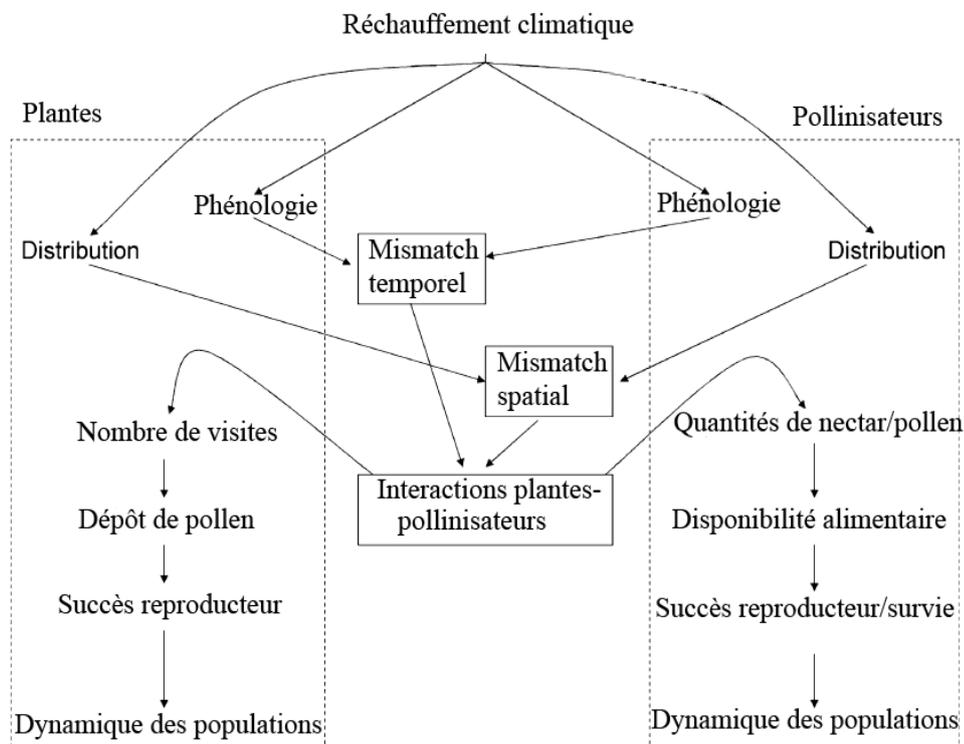


Figure 5 : Impact du réchauffement climatique sur la phénologie (Hegland *et al.*, 2009)

Cependant, des décalages temporels (Fig. 5) pourraient être observés entre certains partenaires mutualistes, ce qui signifie que des pollinisateurs pourraient rater le début de la floraison des plantes qu'ils visitent et qu'inversement des plantes pourraient rater la période à laquelle les insectes les pollinisant apparaissent (Hegland *et al.*, 2009).

L'impact d'un décalage phénologique durant les printemps chauds et précoces semble en réalité difficile à évaluer et mène à des études en apparence contradictoires (Willmer, 2012). Etant donné que le réseau de pollinisation est constitué principalement d'espèces généralistes (de plantes et de pollinisateurs), l'effet du réchauffement climatique pourrait se trouver tamponné. Les espèces plus spécialistes de plantes et de pollinisateurs pourraient dès lors être les plus touchées (Willmer, 2012). En plus d'un décalage phénologique, les réseaux de pollinisation pourraient être impactés de manière plus subtile, avec par exemple une modification de la qualité des récompenses florales. L'étude de Hoover *et al.* (2012) est particulièrement parlante à ce sujet. Cette étude a démontré que les ouvrières de *Bombus terrestris* utilisées dans les expérimentations pouvaient être attirées par un nectar qui de manière paradoxale diminuait leur durée de vie (en particulier le nectar provenant d'un traitement suppléé en azote, lequel est prédit comme devant augmenter dans le futur proche).

1.4. Objectifs

Les conséquences du réchauffement climatique sur les pollinisateurs ainsi que sur les plantes qu'ils visitent sont encore mal comprises. Particulièrement, peu d'études ont mesuré l'impact d'une hausse de température sur la qualité des ressources florales et le comportement de récolte des pollinisateurs. Dans le cadre de ce mémoire, nous estimerons les effets d'une hausse des températures sur la qualité/quantité du nectar et du pollen produits par une plante entomophile. Nous étudierons plus particulièrement les modifications éventuelles de la composition chimique des ressources florales (sucres pour le nectar, polypeptides et acides aminés pour le pollen). Parallèlement, nous étudierons l'effet de ces mêmes températures sur le comportement de récolte de pollinisateur généraliste en mesurant le temps et le taux de visite de butineuses.

Afin de répondre à ces objectifs, nous avons choisi comme modèle d'étude le Bourdon Terrestre d'une part et de la Balsamine de l'Himalaya d'autre part. Ce pollinisateur et cette plante sont des exemples parmi les plus communs de pollinisateur et de plante généraliste.

1.5. Modèles biologiques

1.5.1. *Bombus terrestris*

Bombus terrestris est une des espèces de bourdon les plus communes de nos régions (Fig.6). Cette espèce n'est pas en déclin dans sa distribution originelle. Elle est même en expansion à l'échelle mondiale suite à sa domestication et la commercialisation de colonies (Rasmont *et al.*, 2008). Elle comprend 9 sous-espèces réparties sur le continent européen (Fig.7 ; Rasmont *et al.*, 2008). *Bombus terrestris* est fortement polylectique, pouvant collecter sur des centaines d'espèces de plantes différentes (Rasmont *et al.*, 2008 ; Goulson, 2010 ; Kleijn & Raemakers, 2008). Son choix se porte sur des espèces de plantes ayant des ressources de nectar et de pollen de haute qualité comme les Fabacées, riches en protéines et en acides aminés essentiels (Hanley *et al.*, 2008).



Figure 6 : *Bombus terrestris* butinant
(Pierre Vandenberghe ;
www.observation.be)

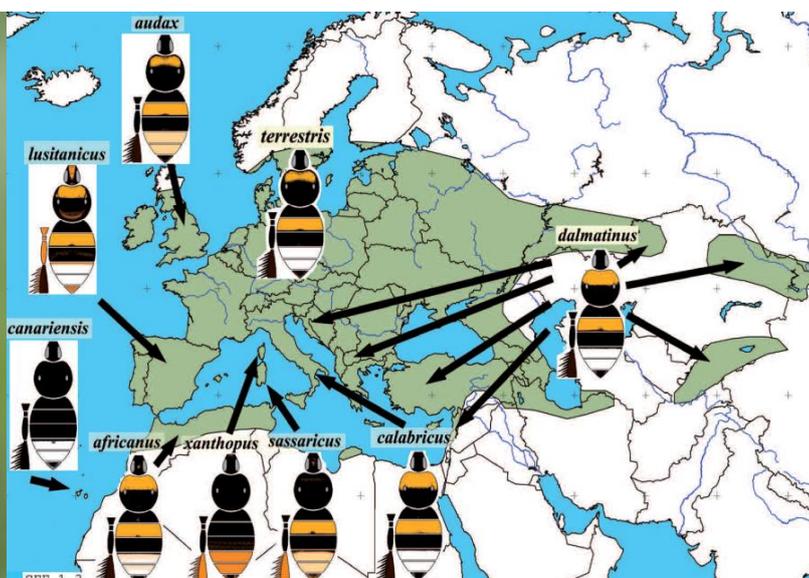


Figure 7 : Répartition géographique des 9 sous-espèces de *Bombus terrestris* (Rasmont *et al.*, 2008)

Les bourdons sont considérés comme des organismes eusociaux primitifs (Goulson, 2010). Le cycle de vie de *Bombus terrestris* se déroule sur une seule année et implique la présence d'une phase solitaire caractérisant son type de socialité (Fig.8). La reine fécondée est tout d'abord à la recherche d'un site de nidification, souvent un ancien nid de rongeur dont elle occupe les galeries. Elle récolte du pollen qu'elle transforme en un pain. Elle maintiendra la colonie à une température de 30/32°C grâce à sa température interne élevée (Heinrich, 1972). Un pot à nectar est fabriqué à l'entrée du nid. La reine pond ses œufs sur le pain de

pollen qui éclosent dans les 4 jours environ. Les larves sont nourries individuellement par un mélange de pollen et de nectar que la reine régurgite. Après quatre stades larvaires et 10 à 14 jours, les larves fabriquent un cocon et se transforment en nymphes. Après 14 autres jours, elles deviennent adultes. Quelques jours après que les premières ouvrières soient sorties, la reine cesse de collecter pollen et nectar, ce travail étant relégué à certaines des nouvelles ouvrières, d'autres aidant la reine au développement du couvain. Lorsque la taille de la colonie devient suffisante, le nid voit apparaître des nouveaux spécimens sexués. Les jeunes reines vierges quittent le nid et se nourrissent abondamment de nectar et de pollen, se constituant ainsi des réserves de graisses substantielles. La reine fécondée remplie de ses réserves de graisse peut dès lors trouver un site d'hibernation, duquel elle émergera vers les mois de février/mars (Goulson, 2010).

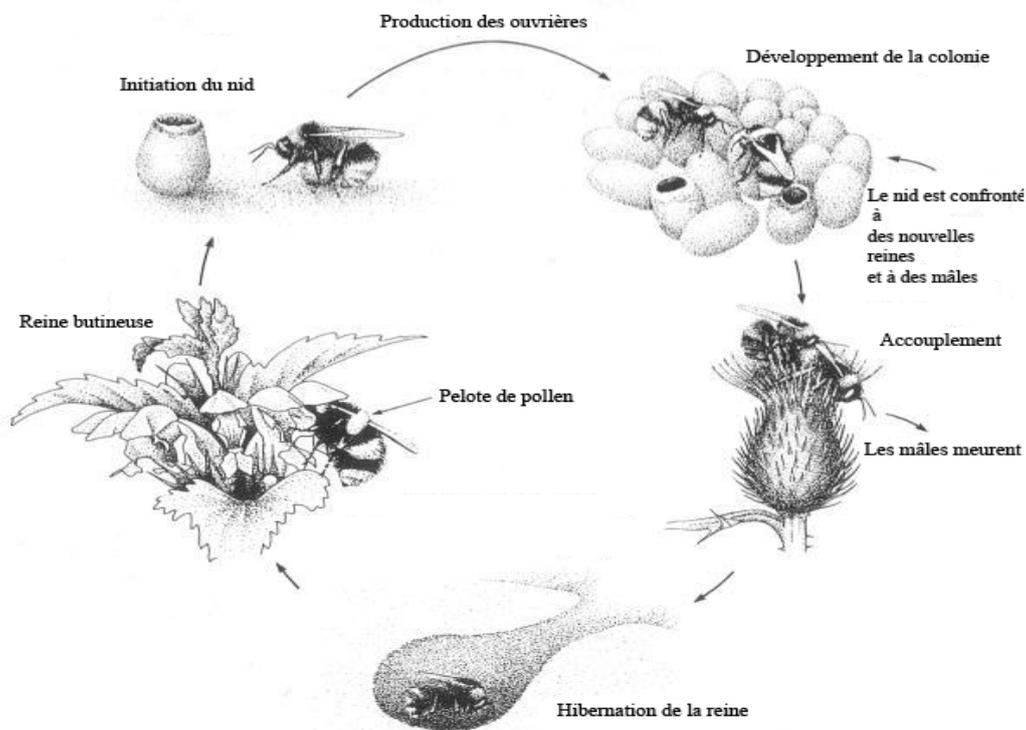


Figure 8 : Cycle de vie de *Bombus terrestris* (<http://apbcn.com/site/Bourdon.htm>)

1.5.2. *Impatiens glandulifera*

Impatiens glandulifera appelée Balsamine de l'Himalaya, Balsamine glanduleuse ou encore Balsamine géante est une plante exotique envahissante en Belgique, originaire de l'Himalaya (Fig.9a). Le genre *Impatiens* comprend plus de 1000 espèces, faisant partie de la famille des Balsaminaceae, elle-même comprise dans le clade des Ericales (Janssens *et al.*, 2009). Il s'agit de la plus grande plante annuelle d'Europe, poussant à plus de 2,50 m (Beerling & Perrins, 1993). Elle est munie de tiges rougeâtres translucides et creuses avec des

racines peu profondes de 10-15cm. Au niveau de l'anatomie foliaire, les feuilles sont opposées ou par 3, glabres, lancéolées à elliptiques, faisant de 5 à 18 cm de long. 18 à 50 dents se retrouvent sur chaque marge. Les fleurs sont disposées en racème axillaire de 3 à 12 fleurs. Ces fleurs sont fortement zygomorphes et hypogynes (Fig. 9 c et d). Cinq pétales sont présents, les pétales latéraux unis composant une lèvre proéminente qui attire les insectes et le pétale dorsal formant une sorte de capuchon caractéristique au-dessus de l'androcée. Le sépale postérieur forme un éperon étroit. La couleur des fleurs va du blanc au mauve foncé en passant par le rose. Les fruits de cette plante sont des capsules loculicides contenant de 4 à 16 graines (Beerling & Perrins, 1993). Ces fruits (Fig.9 b) ont un mode de dissémination autochore, les fruits explosant et libérant leurs graines jusqu'à 5 mètres du pied de la plante mère (Clements *et al.*, 2008). Espèce sensible au gel, elle affectionne les sols bien humides. Elle est très tolérante à la structure et à la texture du sol, pouvant pousser à la fois sur des sols relativement acides ou neutres, et sur des sols riches ou pauvres en nutriments. Cette Balsamine germe vers février-mars, les plantes fleurissant de juillet à octobre (Beerling & Perrins, 1993). Son nectar est sécrété à l'extrémité du calice-éperon et attire beaucoup d'insectes visiteurs car il contient environ 50 % de sucres (Barrow & Pickard, 1984). Cette plante exotique envahissante affectionne les milieux urbains, et s'y multiplie rapidement. Elle peut empêcher par sa densité de population les plantes natives de s'installer le long des berges de cours d'eau. Elle peut attirer également les pollinisateurs comme les bourdons au détriment de ces mêmes plantes (Chittka & Schürkens, 2001).



Figure 9 : **a.** Population d'*Impatiens glandulifera* (Hugues Tinguy ; www.tela-botanica.org) **b.** Capsules loculicides d'*Impatiens glandulifera* (Marie Portas ; www.tela-botanica.org) **c.** Fleur d'*Impatiens glandulifera* (Bertrand Bui ; www.tela-botanica.org) **d.** Fleur d'*Impatiens glandulifera* en phase femelle (Jérôme Canei).

2. Matériel et méthodes

2.1. Dispositifs expérimentaux

2.1.1. Phytotrons

Un phytotron est une enceinte climatisée permettant la croissance et le développement de modèles végétaux sous des conditions de culture précises et contrôlées. Trois de ces locaux appartenant au pool BIOL-AGRO (Bâtiment de Serres, UCL, Louvain-la-Neuve) ont été utilisés. Chacune de ces pièces est réglée à une température déterminée ; les trois températures choisies étant de 21°C (salle 8), 24°C (salle 5) et 27°C (salle 4). Elles sont toutes munies d'un système de brumisation permettant de garder une humidité relative assez élevée (entre 60 et 80%) ainsi que d'une installation lumineuse munies de lampes Phillips 400 W. Le choix des températures s'explique par la nécessité de créer un gradient suffisamment marqué et réaliste par rapport aux prévisions de changement climatique.

2.1.2. Conditions d'expérimentation

Deux séries d'expérience ont été réalisées avec des temps variables d'exposition des plantes dans les phytotrons (environ deux semaines et un mois).

La première série de plantes d'*Impatiens glandulifera*, utilisée au cours du mois de mai 2013, a été obtenue à partir de graines récoltées *in natura* dans trois localités wallonnes : Court St-Etienne, Nimy et Rochefort. La récolte de graines s'est faite sur des individus portant des fruits relativement mûrs prêts à exploser par autochorie. Toutes ces plantes étaient situées le long de cours d'eau (Haine, Semois et Dyle), leur milieu de prédilection. Cette récolte a été réalisée au cours du mois d'août 2012. Ces graines ont ensuite été conservées en chambre froide durant la moitié de l'année 2012. Elles ont ensuite été mises en culture *in vitro* dans des boîtes de Pétri utilisant un substrat nutritif, jusqu'à l'obtention de plantules présentant leurs premiers cotylédons. Ces plantules (84) ont ensuite été transférées dans des pots (de 5L) remplis de terreau universel vers la fin du mois de février 2012. Ces plantules ont par la suite grandi dans les serres du pool AGRO-BIOL jusqu'à l'obtention des premiers individus en fleurs. Une fois la floraison démarrée toutes les plantes ont été transférées dans trois phytotrons sous trois conditions de culture différentes. Vingt-neuf individus ont été soumis à une température de 21°C (salle 8), vingt-huit autres à 24°C (salle 5) et une dernière série de vingt-sept plantes a été placée à 27°C (salle 4) pendant un mois.

La seconde série de plante d'*Impatiens* a été utilisée au cours du mois de septembre 2013. Ces individus, 110, ont été obtenus à partir de plantules récoltés *in natura* au début du mois de juillet 2013. Ceux-ci ont été prélevés sur deux sites présents le long de la Haine dans les communes d'Havré et de Nimy. Ils ont été repotés immédiatement après leur récolte. Du terreau universel fut utilisé comme substrat et toutes les plantes juvéniles ont été placés tout le mois de juillet 2013 dans les serres de l'UMONS (Plaine de Nimy, Laboratoire de Zoologie). 74 individus eurent une reprise et un développement suffisant. Un arrosage et des mises sous tuteurs quotidiens ont été effectués. Ces plantes furent ensuite transférées dans les serres du pool AGRO-BIOL (Louvain-la-Neuve) au début du mois d'aout 2013. Le nombre total d'individus ayant atteint la maturité et la floraison est de 48 individus. Elles furent ensuite transférées en phytotrons au tout début du mois de septembre 2013. Le placement de ces plantes a été effectué de manière aléatoire avec 16 individus pour chacune des salles. Un rapatriement des plantes vers les locaux de l'UMONS (Plaine de Nimy, Chaville V, salle de préparation) a été réalisé en vue d'effectuer à la fois des manipulations identiques à celle du mois de mai et des manipulations éthologiques (décrites plus loin). Après une exposition de 10 à 18 jours, chacun des 3 groupes s'est vu rapatrié au fur et à mesure afin de procéder à ces expérimentations. Le 1^{er} groupe (10 jours d'acclimatation à 21°C) fut d'abord rapatrié et transféré dans la salle d'expérimentation, quatre jours plus tard le 2^{ème} groupe (14 jours d'acclimatation à 24°C) le fut également et enfin le dernier groupe (18 jours d'acclimatation à 27°C).

2.2. Mesures morphologiques et analyses des récompenses florales

2.2.1. Mesures morphologiques

La série de plante étudiée est celle ayant été soumise pendant un mois aux 3 températures choisies (21°C, 24°C et 27°C). Cette série ayant été élevée dès le stade embryonnaire, les conditions de croissance ont pu être contrôlées plus finement que le groupe de plantes ayant subi un stress thermique de deux semaines (lequel a été prélevé *in natura*). Les différents paramètres étudiés concernent tout d'abord deux types de mesures exprimant la croissance de chaque plante (chaque plante possédant au moins une fleur ouverte ayant été étudiée). Il s'agit tout d'abord de la longueur de la feuille la plus longue au niveau du 8^{ème} nœud. Ce nœud en particulier est choisi comme point de comparaison car étant le nombre minimal de nœud présent parmi toutes les plantes étudiées. Au niveau de ce 8^{ème} nœud, la

longueur de la feuille la plus longue est mesurée (en centimètres). Ensuite la hauteur, en centimètres, de chacun des individus est évaluée. Le nombre total de nœuds en tant qu'autre paramètre physiologique lié à la croissance est également évalué.

2.2.2. Prélèvement du pollen

Des prélèvements de pollen ont été réalisés sur les deux séries de plantes.

Pour la première série, le prélèvement des anthères a été effectué durant 4 jours consécutifs durant la fin du mois de mai 2013. Afin de standardiser notre échantillonnage, le prélèvement a toujours été effectué aux mêmes heures (entre 9h30 pour le groupe à 21°C et 14h pour le groupe à 27°C). Une fleur par plante est étudiée. Les fleurs prélevées sont chaque fois situées au niveau d'un même nœud. Le nœud choisi correspond à chaque fois au nœud comprenant le plus de fleurs ouvertes. Il est marqué à l'aide d'une ficelle colorée et ce, quelques jours avant le début des expérimentations. Lorsqu'il n'y a plus de fleurs disponibles au niveau du nœud marqué, une fleur située sur le nœud supérieur ou inférieur est choisie. Les fleurs considérées sont uniquement celles étant en phase femelle (donc après déhiscence des anthères). Une vingtaine de fleurs sont récoltées chaque jour (1 fleur en phase femelle par plante par jour) pour les trois traitements (trois températures). Une fois prélevées, les anthères sont placées dans un tube eppendorf. Les tubes ont ensuite été placés au congélateur à -20°C pour éviter toute dégradation. Les contenus des tubes sont ensuite triés afin de séparer le pollen des anthères et d'enlever les impuretés. Ceci est réalisé sur une plaque en verre et à l'aide d'une pince, toujours en minimisant les temps d'exposition aux températures trop élevées.

Pour la deuxième série, nous avons suivis le même protocole durant le mois de septembre 2013 mis à part que le prélèvement a été effectué sur deux jours consécutifs pour chaque condition et non sur quatre jours.

2.2.3. Analyse des polypeptides du pollen

Chacun des échantillons de pollen est préalablement lyophilisé et divisé en six répliques d'environ 5 mg avant analyse. Cette manipulation a été effectuée au sein de l'UMONS, dans le laboratoire de Protéomique et Microbiologie du professeur Ruddy Wattiez. Le protocole utilisé lors de ces analyses est celui développé par Vanderplanck *et al.* (2013). Le nombre de répliques par groupe est le suivant : 21°C/2Sem : 3 ; 24°C/2sem : 2 ; 27°C/2sem : 4 ;

21°C/1mois : 4 ; 24°C/1mois : 6; 27°C/1mois : 3. Au total vingt-deux répliques ont été étudiés. Ce chiffre s'explique par la quantité limitée de pollen disponible.

Le pollen est tout d'abord broyé mécaniquement à l'aide de petites billes de verre et d'un passage dans l'azote liquide, cette étape étant répétée cinq fois de suite. Ces étapes permettent une élimination plus aisée des contaminants.

L'élimination des contaminants et des pigments présents dans les échantillons de pollen est effectuée grâce une série de 3 bains successifs. La première étape utilise de l'acide trichloroacétique 10% dans l'acétone, suivi par un bain d'acétate d'ammonium méthanolique (0,1 M dans du méthanol 80%), et en terminant par un bain d'acétone 80%. Chaque échantillon est centrifugé entre ces étapes, le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé dans chaque nouveau bain par homogénéisation au vortex. Toutes ces étapes se font en chambre froide à 4°C. Le dernier bain est suivi d'une étape d'évaporation réalisée à l'aide d'une plaque chauffante (50°C) durant approximativement 10 min, afin d'éliminer les dernières traces d'acétone.

L'échantillon de pollen est donc maintenant nettoyé et séché. Le culot obtenu est ensuite resolubilisé dans 500 µl de tampon d'extraction (30% sucrose, 2% SDS, 0,1 M tris-HCl, 5% 2-mercaptoéthanol, pH 8,0). Pendant 10 minutes l'échantillon est placé à 4°C et sous agitation. 500 µl de phénol sont par après ajoutés dans l'ependorf, celui-ci étant placé sous agitation pendant 10 min. Le tampon a permis l'extraction et la mise en solution des polypeptides qui vont maintenant passer dans la phase phénolique supérieure. Une partie de cette phase (400 µl) est récupérée et transférée dans un nouvel eppendorf dans lequel est rajouté 1600 µl d'acétate d'ammonium méthanolique 0,1M glacé.

Après avoir été vortexé, notre tube est placé une nuit au congélateur à -20°C permettant ainsi une purification des polypeptides par précipitation. L'échantillon est ensuite centrifugé et le culot polypeptidique est délicatement récupéré après avoir vidé le surnageant. Les résidus phénoliques sont éliminés tout comme les traces éventuelles de contaminants par une nouvelle série de bain successifs. Tout d'abord du méthanol glacé (100%) et ensuite une solution d'acétone glacé (80%). Comme précédemment, le surnageant est à chaque fois éliminé et l'échantillon centrifugé.

Un tampon chlorhydrate de guanidine 4M est maintenant utilisé afin de resolubiliser les polypeptides purifiés. Celui-ci est rajouté dans le tube après avoir laisser brièvement sécher notre échantillon à l'air libre.

Un test colorimétrique est ici utilisé, pour quantifier les polypeptides, il s'agit du BCA Protein Assay. Le réactif BCA employé va réagir avec les liens peptidiques des polypeptides présents. Il est composé de deux éléments : un réactif A (acide bicinchoninique) et d'un réactif B (sulfate de cuivre) (B:A, 1:50). Le complexe résultant présente une couleur pourpre dont l'intensité est proportionnelle à la concentration polypeptidique de l'échantillon.

La quantification à proprement parler s'effectue à l'aide d'une plaque multipuits. Par la dilution d'un standard BSA 1mg/ml dans du tampon chlorhydrate de guanidine 4 M, quatre courbes de calibration quadratiques seront réalisées sur cette plaque. Celle-ci est placée sur un agitateur, sous 37°C, et ce pendant 30 minutes. La plaque est ensuite insérée dans un lecteur de plaque multipuits. Le programme OPTIMA permettra de mesurer les densités optiques à 570 nm. Trois mesures seront réalisées ; une première directement après incubation, une après 5 minutes et une dernière après 10 minutes. Etant donné que chaque échantillon est représenté par deux à six répliques et que le programme effectue trois mesures, 6 à 18 valeurs seront obtenues pour chaque échantillon de pollen. La concentration moyenne en polypeptides sera dès lors déterminée grâce à l'ensemble de ces valeurs.

2.2.4. Analyses des acides aminés totaux du pollen

Chacun des échantillons de pollen est préalablement lyophilisé à froid durant une nuit. Le lyophilisateur utilisé, situé au sein du service de Biologie Marine du professeur Eeckhaut, agit grâce à une température basse et une différence de pression importante. Chaque échantillon de pollen lyophilisé est reparti en 6 répliques d'environ 3 mg. Cette répartition a été réalisée par l'unité de chimie biologique industrielle de l'Université de Liège (Gembloux Agro Bio-Tech). Six groupes étant analysés (21°C- 24°C-27°C pour les deux séries), un total de 34 échantillons a été obtenu (5 échantillons pour les groupes suivants : 24°C/deux semaines et 21°C/1mois ; 6 répliques/échantillons pour tous les autres groupes).

Les analyses ont été réalisées au sein de l'unité de chimie biologique industrielle de l'Université de Liège (Gembloux Agro Bio-Tech). Les 34 échantillons ont été analysés en triplicatas suivant le protocole de Vanderplanck *et al.* (2014).

Chaque échantillon a été mis en présence de 1ml de solution d'hydrolyse acide (HCl 6N, 0,1% de phénol et 500 µM norleucine). Pour éviter une dégradation de la méthionine, chaque tube est mis sous azote pendant une minute avant d'être chauffé à 110°C et ce pendant 24 heures. Un bain à ébullition de 100°C sert ensuite à faire évaporer, sous vide, l'hydrolysate.

Une solution tampon de citrate de sodium (pH 2,2) est ensuite utilisée, chaque échantillon sec étant mélangé à 1 ml de cette solution. Chacune des solutions est par la suite homogénéisée, filtrée (0,2 µm) et enfin transférée dans un flacon HPLC avant d'être injectée.

Une analyse employant un chromatographe échangeur d'ion (analyseur d'acides aminés Biochrom 20plus) a permis d'identifier et de quantifier chaque acide aminé. Ces acides aminés ont été séparés à l'aide d'un gradient pH du tampon citrate de sodium et grâce aux valeurs de pKa des acides aminés individuels. Des dérivés colorés sont ensuite obtenus grâce à une réaction ninhydrine post colonne. Ces dérivés sont détectés par UV (570 nm sauf la proline qui est détectée à 440 nm). Une comparaison des aires des différents acides aminés avec le standard de norleucine a permis de quantifier ceux-ci. Pour chacun des acides aminés, des injections de solution standard ont servi à établir leurs différents facteurs de réponse. Le tryptophane est le seul acide aminé à avoir été exclu de cette analyse. En effet, lors de l'hydrolyse acide celui-ci est détruit et son analyse nécessite une quantité de pollen trop importante. Il est à signaler que le tryptophane est un facteur rarement limitant bien qu'il soit un acide aminé essentiel chez *Apis mellifera* par exemple (Standifer *et al.*, 1980).

2.2.5. Prélèvement du nectar

Des prélèvements de nectar ont été réalisés sur les deux séries de plantes. Le prélèvement de nectar a été effectué uniquement sur les fleurs en phase femelle. Celui-ci a été effectué durant 4 jours consécutifs durant la fin du mois de mai 2013 et suit les mêmes précautions que celle décrites précédemment pour la collecte de pollen. Une fleur par plante par jour d'expérimentation fut également utilisée. Durant le mois de septembre 2013 une autre série de prélèvement a été effectuée. Le protocole suivi fut identique mis à part que le prélèvement a été effectué sur deux jours consécutifs pour chaque condition et non sur quatre jours. Le nectar est récolté manuellement à l'aide de microcapillaires de 10 µl de volume (Hirschmann® Laborgerate). Le volume de nectar est calculé à l'aide d'un pied à coulisse, sachant que la longueur (32 mm) et le volume maximal du capillaire sont connus d'avance. Deux types d'analyses sont effectués sur le nectar : l'estimation de la concentration en saccharose ainsi que l'analyse qualitative et quantitative des différents sucres présents dans ce nectar. Chaque microcapillaire contenant du nectar est placé à l'intérieur d'un tube eppendorf. Ce tube est ensuite immédiatement plongé dans un thermo portable contenant de l'azote liquide afin d'éviter toute altération ou dégradation. Chaque tube est ensuite transféré dans un congélateur à -80°C.

Pour la seconde série, il est à noter que la prise de nectar s'effectuant parallèlement aux études comportementales décrites ci-après, les plantes destinées à être manipulées pour ces récompenses florales ont vu deux de leurs fleurs ensachées dans du tulle (Fig. 10). Ceci permet d'éviter un biais très probable sur les quantités récoltées de pollen et de nectar, biais du aux visites florales des ouvrières de *B. terrestris*.



Figure 10 : Fleur d'*Impatiens glandulifera* ensachée dans du tulle

2.2.6. Mesure de la concentration en saccharose du nectar

Ces mesures ont été effectuées exclusivement sur le groupe de plantes soumis durant environ deux semaines aux 3 températures fixées (21°C, 24°C, 27°C) et ce pour une question de disponibilité de matériel. Un sous groupe de 8 plantes a été choisi de manière aléatoire parmi chacun des groupes de 16 plantes subissant une des trois conditions expérimentales. Les mesures de la concentration en sucre ont été réalisées à l'aide d'un refractomètre (Fig. 11). Il s'agit d'un instrument de mesure permettant la détermination de la concentration en saccharose d'un liquide quelconque. Son fonctionnement est basé sur la réfraction des rayons lumineux à travers ce liquide en question. La réfraction diffère en fonction du contenu en saccharose du liquide, donc du nectar dans notre cas. Une délimitation colorée permet de visualiser immédiatement la valeur de la concentration en saccharose, mesurée en pourcentage Brix. A l'aide d'une micro-poire le contenu de chaque microcapillaire est expulsé

sur le prisme du réfractomètre et suite à l'abaissement du couvercle permettant l'étalement du nectar, la valeur obtenue est compilée.



Figure 11: réfractomètre Bellingham & Stanley, modèle: Eclipse Professional 45-80°Brix

2.2.7. Analyse qualitative et quantitative des polysaccharides du nectar

Le prélèvement de nectar a été effectué sur les deux séries de plantes (un mois et deux semaines de stress thermique). Il a été réalisé de manière aléatoire sur les 3 groupes de température de chaque série. (mai : 21°C , n = 6 ; 24°C, n = 10 ; 27°C , n= 6 ; septembre :21°C, n = 4, 24°C, n = 4 ; 27°C, n = 4). Chaque microcapillaire contenant du nectar est placé à l'intérieur d'un tube eppendorf. Ce tube est ensuite immédiatement plongé dans un thermo portable contenant de l'azote liquide afin d'éviter toute altération ou dégradation. Chaque tube est ensuite transféré dans un congélateur à -80°C. L'analyse à proprement parler a été réalisée par le pôle Agrosiences de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse (UMR 406 INRA UAPV Abeilles et Environnement, INRA, Avignon). La composition en sucres a été déterminée par chromatographie ionique. La technique utilisée est une analyse en HPIC, c'est-à-dire une chromatographie ionique de haute performance. Le résultat obtenu est un chromatogramme dont les valeurs sont exprimées en nano-moles (nmoles). Chaque pic apparaît à un temps de rétention qui est propre à un sucre bien particulier. Seuls les trois sucres principaux du nectar ont été analysés, à savoir le saccharose, le fructose et le glucose. Les deux groupes de plantes ont été investigués (1 mois d'exposition pour l'un, environ deux semaines pour l'autre)

2.3. Etudes du comportement

Les expériences sur le comportement de *Bombus terrestris* ont été réalisées dans une salle climatisée situé au sous-sol du Chaville 5 (UMons, Plaine de Nimy). Le chauffage est assuré par deux convecteurs muraux AEG (WKL 2003 U 2kW) ainsi qu'un climatiseur Everglades (EV9057 1050 W). A l'aide de ces dispositifs, la température souhaitée pour chaque condition est maintenue de jour le plus précisément possible ($\pm 1^{\circ}\text{C}$). Un thermohygromètre situé au milieu de ce local permet de visualiser cette température.

Trois colonies de *Bombus terrestris* sont disposées l'une à côté de l'autre, sur une table d'expérimentation, face aux individus d'*Impatiens glandulifera* localisés au milieu de la pièce. Le choix de 3 colonies (Fig. 12) est du au fait que ce nombre permet d'avoir un nombre minimal exploitable d'ouvrières effectuant des visites florales et cela permet d'éliminer par ailleurs la variabilité comportementale de chacune des colonies.



Fig. 12 : colonies de *Bombus terrestris* utilisées (firme Biobest)

Chacune des colonies comprend une centaine d'ouvrières. Les plantes sont disposées de manière équidistante à environ 2 à 3 m de l'ouverture des colonies (Fig. 13).

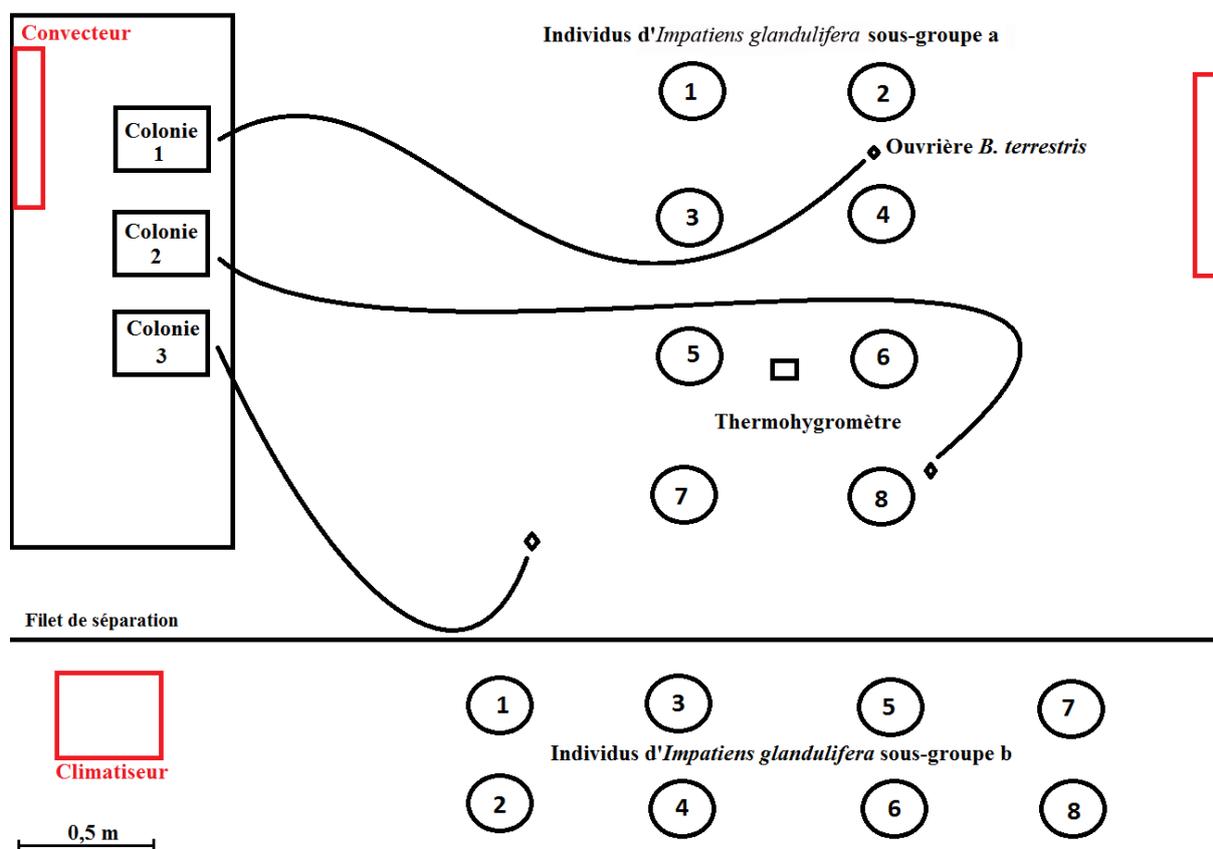


Figure 13 : Dispositif expérimental

Trois séries de plantes sont présentées l'une après l'autre aux ouvrières des 3 colonies. Chacune de ces séries, correspondant à une température particulière. Chaque groupe reste au total 4 jours à chaque température, donc 4 jours d'étude sont réalisés sur le groupe à 21°C, 4 jours sur le groupe à 24°C et les quatre derniers jours le groupe à 27°C est investigué. Chaque groupe de plantes acclimaté à une température précise est composé de 16 individus. Un filet est tendu de part et d'autre de la pièce afin de séparer deux sous-groupes. Un des deux sous-groupes est accessible aux ouvrières de *Bombus terrestris* tandis que l'autre ne l'est pas, le filet protégeant les plantes destinées à être manipulées uniquement pour la collecte de pollen et de nectar. Pour chacune des températures, un premier sous-groupe de 8 plantes est présenté aux ouvrières de *Bombus terrestris* et ce pendant une durée de deux jours. Un deuxième sous-groupe composé également de 8 plantes est ensuite présenté pendant une durée équivalente. La séparation en deux sous-groupes permet une observation plus aisée des ouvrières ainsi qu'une collecte de nectar et de pollen facilitée pour les sous-groupes protégés par le filet

Pour que l'adaptation des colonies à chaque nouvelle condition soit optimale et que les plantes rapatriées depuis les phytotrons restent dans leurs conditions de température

respectives, la température propre à chacun des 3 groupes est atteinte la veille au soir de chaque rapatriement depuis les phytotrons. Le soir précédent les 12 jours consécutifs de manipulations, les sources de biogluc (solution sucrée provenant de la firme Biobest) de chaque colonie sont retirées. De cette manière toutes les ouvrières sont forcées de récolter du nectar (et du pollen) en dehors de leurs nids.

L'étude éthologique à proprement parler consiste à évaluer le taux et le temps de visite des ouvrières de *Bombus terrestris* collectant du nectar et/ou du pollen sur les fleurs des individus d'*Impatiens glandulifera*. Le taux de visite étant le nombre de fleurs visitées par minute et le temps de visite le temps passé par une ouvrière sur chaque fleur. L'utilisation d'un chronomètre permet d'effectuer ces mesures. En plus de ces deux mesures, la présence de pelotes de pollen dans les corbeilles de chaque bourdon est notée. Toutes ces mesures sont effectuées 3 fois par jour (9H-10H/13H-14H/17H-18H) et ce sur quatre jours, pour chacune des 3 conditions testées. Pour chacun des groupes étudiés il y a donc un total de 12 mesures, 4 pour chaque créneau horaire. Les 12 jours d'étude s'enchainent de manière ininterrompue afin de minimiser une floraison des balsamines trop tardive et un vieillissement trop important des colonies, éléments pouvant influencer sur les résultats. Le tableau 1 récapitule les observations éthologiques menées. Les ouvrières des 3 colonies ne sont pas marquées, par conséquent chaque individu choisi aléatoirement peut provenir d'une de ces colonies. A chaque séance (d'une heure) d'observations, un nombre maximal de 12 ouvrières est suivi.

Tableau 1 : planning des observations comportementales

JOUR	J1	J2	J3	J4	J5	J6
Température du groupe	21°C	21°C	21°C	21°C	24°C	24°C
Calcul du taux de visite	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H
Calcul du temps de visite	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H
Ouvrières suivies	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance
JOUR	J7	J8	J9	J10	J11	J12
Température du groupe	24°C	24°C	27°C	27°C	27°C	27°C
Calcul du taux de visite	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H
Calcul du temps de visite	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H	9H-10H 13H-14H 17H-18H
Ouvrières suivies	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance	12/séance

2.4. Analyses statistiques

Les différents tests statistiques utilisés lors de cette étude, ainsi que les différents graphiques présentés ont été réalisés grâce au logiciel R (version 3.0.2).

2.4.1. Analyse de la variance

Les données des paramètres suivants ont été soumises à une analyse de la variance (ANOVA), suivi d'une comparaison multiple des moyennes (test post-hoc de Tukey) : concentration en saccharose du nectar et mesures morphologiques (hauteur, longueur, nombre de nœuds). Ces tests nous ont permis de détecter une éventuelle différence significative au sein des valeurs obtenues pour chacun des paramètres ici mentionnés. S'agissant d'un test paramétrique, nous avons préalablement vérifié si les conditions d'application suivantes étaient bien remplies : (i) échantillonnage aléatoire, (ii) observations indépendantes, (iii) une variable quantitative, (iv) une variable qualitative à 3 niveaux ou plus, (v) homoscedasticité ou égalité des variances (test de Bartlett, $H_0 =$ égalité des variances) et (vi) normalité de la distribution des résidus (test de Shapiro, $H_0 =$ distribution normale).

Le seuil α fixé pour les différents tests (Bartlett, Shapiro et ANOVA) est de 5%. Si il existe une différence significative entre les valeurs obtenues pour chacun des paramètres évoqués plus haut, l'interprétation de la *p-value* retournée par l'analyse de la variance nous permettra de la détecter. Grâce au test post-hoc ces différences pourront ensuite être ciblées avec précision, celui-ci retournant une *p-value* pour l'ensemble des groupes comparés deux à deux. Des boîtes de dispersion nous permettront de visualiser nos données, en présentant notamment les résultats des comparaisons multiples.

Lorsque les conditions d'application de l'ANOVA n'ont pas été remplies (Bartlett $<5\%$ et/ou Shapiro $<5\%$), même après transformation des données, un test de Kruskal-Wallis a été appliqué. Ce test non paramétrique nous permet de déterminer les différences éventuelles existant entre groupes. Si la *p-value* renvoyée est inférieur à 5 %, un test post-hoc de comparaison multiple, nous a permis comme par le test de Tukey, de préciser en détails ces différences. A contrario du test de Tukey nous renvoyant une *p-value* à interpréter, les tests de comparaison multiple nous indiquent directement si une comparaison débouche sur une différence qui est statistiquement significative ou non.

2.4.2. Analyses multivariées

Les différents échantillons analysés dans le cadre d'une étude biologique, sont souvent accompagnés d'un grand nombre de variables. Des tailles conséquentes pour les tableaux de données de type « cas x variables » sont alors obtenues. La visualisation des données dans un espace à faible dimension, chaque variable représentant une dimension, devient alors impossible.

Il existe par ailleurs un haut degré de similitude entre les matrices de données chimiques et les matrices de communautés écologiques. Des méthodes d'analyses multivariées utilisées de manière récurrente pour les données de communautés écologiques ont par conséquent été appliquées.

2.4.2.1. Positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS)

Afin d'évaluer de manière visuelle les éventuelles différences de composition en acides aminés essentiels parmi les échantillons de pollen, un positionnement multidimensionnel non métrique (nMDS ; non Metric Multidimensional Scaling) a été réalisé. Les résultats associés aux compositions en polysaccharides du nectar ont également été traité par ce positionnement.

Le positionnement multidimensionnel non métrique est fréquemment utilisé dans le domaine de la visualisation d'information. Il permet d'établir une relation non-paramétrique entre les dissimilarités des données ainsi que de localiser chaque objet dans un espace à faible dimension.

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

Le modèle nMDS a pour but de minimiser une fonction de *stress* (si < 0.2 , l'interprétation des résultats est écologiquement utilisable). Cette fonction *stress* est générée à l'aide de 10 itérations du nMDS pour des dimensions allant de $n = 1$ à $n = 5$. Le nombre acceptable de dimensions a été déterminé grâce à l'application d'un seuil limite conventionnel $< 0,2$. La procédure nMDS, utilisant le nombre approprié de dimensions, a été répétée avec 50

itérations pour explorer l'espace d'ordination à cette dimensionnalité. La fonction *stress* minimale a été utilisée afin d'obtenir les graphes nMDS. Chaque point représente un échantillon de pollen et/ou de nectar. La distance spatiale entre ces points indique une différence relative dans la composition chimique.

2.4.2.2. Analyse multivariée de la variance par test de permutation

Un jeu de données composé de plusieurs variables dépendantes requière l'utilisation de tests multivariés. Des tests univariés indépendants effectués sur chacune des variables peuvent en effet mener à des différences significatives qui ne sont peut-être pas réelles. Une analyse multivariée de la variance par test de permutation (PerMANOVA ; Permutational Multivariate Analysis of Variance) a été réalisée afin de tester l'hypothèse nulle de non différence entre les compositions chimiques des différents échantillons de pollen et de nectar.

La perMANOVA est une version de la MANOVA traditionnelle utilisant des permutations. Cette méthode statistique non paramétrique nous permet de ne pas devoir remplir les postulats de base normalement nécessaires aux statistiques paramétriques (normalité multivariée ou égalité des variances).

De la même manière que pour les analyses conventionnelles de la variance, la perMANOVA calcule une statistique F basée sur les valeurs de dissimilarités entre et au sein des différents groupes. Plus cet indice F est important, plus les différences entre les groupes existent.

La distance de Bray-Curtis est utilisée entre les échantillons avec la permutation des données pour produire la *p-value* indispensable à l'interprétation du test, une différence significative étant ou non détectée.

2.4.2.3. Analyse des composés indicateurs

Afin d'identifier les composés qui sont éventuellement exclusivement présents dans le pollen et le nectar de certains groupes de plantes, une analyse de composés indicateurs a été réalisée. Celle-ci est basée sur le principe de l'IndVal et est habituellement utilisée avec des données d'espèces mais peut être également effectuée avec des données chimiques.

Ce test calcule la probabilité d'un composé à se retrouver uniquement en association avec un échantillon d'une espèce donnée ou en ce qui nous concerne d'un seul groupe de

plantes de la même espèce. Une valeur indicatrice-qui est fonction de l'abondance et de la fréquence relative du composé- est calculée pour chaque composé chimique (en l'occurrence chaque acide aminé essentiel ou chaque carbohydrate) et permet pour chaque échantillon d'identifier le composé avec la plus grande valeur indicatrice. Une *p-value* est calculée pour chaque combinaison échantillon/composé afin de déterminer si certains composés indicateurs sont significatifs. Ces *p-value* sont corrigés par la correction de Holm afin d'éviter l'erreur de type 1 due aux analyses multiples.

2.4.2.4. ANOVA à 2 facteurs croisés

Les résultats associés aux évaluations du taux de polypeptides ont été soumis à une analyse de la variance (ANOVA) à 2 facteurs croisés (durée et température). Une comparaison multiple des moyennes (test post-hoc de Tukey) a ensuite été effectuée pour chacun de ces paramètres. Ces tests nous ont permis de détecter une éventuelle différence significative au sein des valeurs obtenues pour chacun des paramètres ici mentionnés. S'agissant d'un test paramétrique, il est indispensable de vérifier que les conditions d'application suivantes soient bien remplies : (i) échantillonnage aléatoire, (ii) observations indépendantes, (iii) une variable quantitative, (iv) une variable qualitative à 3 niveaux ou plus, (v) homoscedasticité ou égalité des variances (test de Breusch-Pagan, H_0 = égalité des variances) et (vi) normalité de la distribution des résidus (test de Shapiro, H_0 = distribution normale).

Le seuil α fixé pour les différents tests (Breusch-Pagan, Shapiro et ANOVA) est de 5%. Si il existe une différence significative entre les valeurs obtenues pour chacun des paramètres évoqués plus haut, l'interprétation de la *p-value* retournée par l'analyse de la variance nous permettra de la détecter. Grâce au test post-hoc ces différences pourront ensuite être ciblées avec précision, celui-ci retournant une *p-value* pour l'ensemble des groupes comparés deux à deux. Des boîtes de dispersion nous permettront de visualiser nos données, en présentant notamment les résultats des comparaisons multiples.

3. Résultats

3.1. Impact de la température sur la morphologie d'*Impatiens glandulifera*

La longueur des feuilles varie de 21 à 37cm pour le groupe exposé à 21°C, de 20 à 30 cm pour celui à 24°C et enfin de 14 à 22 cm pour le groupe exposé à 27°C. Tout groupe confondu, le nombre final de nœuds varie quant à lui de 11 à 18. La hauteur finale des individus d'*I. glandulifera* variant elle de 82 à 188 cm.

Les analyses statistiques indiquent qu'aucun effet significatif de la température n'est détecté sur la croissance de la tige, que ce soit en terme de hauteur ($H = 4,233$; $p = 0,120$) ou de nombre de nœuds ($F = 1,115$; $p = 0,297$) (Tableau 2). A l'inverse, une différence significative de la croissance des feuilles est détectée selon la température de culture des plantes ($H = 8,548$; $p = 0,014$). Les comparaisons multiples ont permis d'établir que les plantes cultivées à 27 °C présentent une croissance des feuilles significativement plus faible que celles cultivées à 21 °C, les plantes élevées à 24 °C présentant une croissance de feuilles intermédiaire (Tableau 2).

Tableau 2. Paramètres de croissance mesurés sur différents plants d'*Impatiens glandulifera* cultivés dans différentes conditions thermiques pendant un mois. Les données sont exprimées sous forme de facteur (pas d'unité) et présentées en tant que moyenne \pm écart-type). Ces facteurs ont été calculés pour les 3 paramètres en suivant la formule suivante : (valeur finale-valeur initiale)/valeur initiale. Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples paire par paire, deux valeurs partageant la même lettre ne différant pas significativement l'une de l'autre.

Température d'exposition	Croissance des feuilles	Croissance de la tige en hauteur	Croissance de la tige en nombre de nœuds
21 °C (n=12)	0,0615 \pm 0,068 b	0,098 \pm 0,073a	0,111 \pm 0,07 a
24 °C (n=21)	0,0310 \pm 0,050 ab	0,096 \pm 0,117a	0,097 \pm 0,06 a
27 °C (n=12)	0,020 \pm 0,048 a	0,164 \pm 0,117a	0,142 \pm 0,07 a
Résultats statistiques	H = 8,5475 $p = 0,014$	H = 4,2331 $p = 0,12$	F = 1,1151 $p = 0,297$

3.2. Impact de la température sur les ressources florales

3.2.1. Nectar

3.2.1.1. Volume de nectar

Les mesures ont uniquement été effectuées sur les plantes exposées durant deux semaines aux différents stress thermiques. Tout groupe confondu les volumes mesurés allaient de 0,3 à 4,34 μl .

Bien que le volume de nectar produit par les plants de Balsamine cultivés à 27 °C semble plus faible, l'analyse de la variance ne détecte aucune différence significative entre les volumes de nectar produits, quelle que soit la température à laquelle les plantes ont été soumises (Tableau 3). Il est cependant probable qu'aucune différence significative ne soit détectée en raison du plus faible nombre de réplicas effectués à 27 °C (i.e. plan non équilibré affectant la robustesse du test).

Tableau 3. Volumes de nectar produits par les différents plants d'*Impatiens glandulifera* cultivés dans différentes conditions thermiques pendant deux semaines. Les données sont exprimées en μl et présentées en tant que moyenne \pm écart-type. Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples paire par paire, deux valeurs partageant la même lettre ne différant pas significativement l'une de l'autre.

Température d'exposition	Volume de nectar (μl)	Résultats statistiques
21 °C (n=15)	1,24 \pm 0,71 a	F = 0,4827
24 °C (n =21)	1,63 \pm 1,4 a	p = 0,4917
27 °C (n=2)	0,46 \pm 0,21 a	

3.2.1.2. Concentration en saccharose

Les mesures ont uniquement été effectuées sur le nectar issu des plantes exposées durant deux semaines aux différents stress thermiques. Les concentrations en saccharose pour le groupe soumis à 21°C allaient de 68 à 78%, de 53 à 76% pour le groupe à 24°C et de 57 à 78% pour celui à 27°C. Le test de Kruskal-Wallis détecte une différence significative de la concentration en saccharose en fonction de la température de culture de l'espèce (H = 6,602 ; p = 0,037). Les comparaisons multiples indiquent que cette différence concerne le nectar des plantes élevées à 21 °C et 24 °C (Tableau 4).

Tableau 4. Concentration en saccharose du nectar produit par différents plants d'*Impatiens glandulifera* cultivés dans différentes conditions thermiques pendant deux semaines. Les données sont exprimées en % Brix sous forme de moyennes (\pm écart-types). Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples paire par paire, deux valeurs partageant la même lettre ne différant pas significativement l'une de l'autre.

Température d'exposition	Concentration en saccharose (% Brix)	Résultats statistiques
21°C (n=10)	73.15 \pm 3.38) b	H =6.6019
24°C (n=11)	66.18 \pm 6.75) a	$p = 0.037$
27°C (n=2)	67.50 \pm 14.85 ab	

3.2.1.3. Profil en carbohydrates

Les concentrations obtenues montrent que le saccharose est le sucre le plus abondant avec une concentration moyenne pouvant aller jusque 1,356 mg/ μ l. Il est suivi par le fructose et par le glucose qui dans tous les groupes est le sucre le moins abondant (Tableau 5).

Tableau 5. Concentrations en carbohydrates du nectar évaluées sur différents plants d'*Impatiens glandulifera* cultivés dans différentes conditions thermiques et durant des périodes d'exposition différentes. Les concentrations en saccharose, fructose et glucose sont exprimées en mg/ μ l et présentées en tant que moyenne \pm écart-type. Les concentrations totales en ces trois sucres sont également mentionnées. Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples paire par paire, deux valeurs partageant la même lettre ne différant pas significativement l'une de l'autre.

	21 °C		24 °C		27 °C	
	2 sem. (n=4)	1 mois (n=27)	2 sem. (n=10)	1 mois (n=39)	2 sem.	1 mois (n=19)
Saccharose	1,356 \pm 0,197 a	0,989 \pm 0,275 b	0,743 \pm 0,577 a	0,684 \pm 0,270 a	/	0,557 \pm 0,251 a
Fructose	0,318 \pm 0,076 b	0,129 \pm 0,072 b	0,056 \pm 0,055 a	0,102 \pm 0,082 b	/	0,043 \pm 0,044 a
Glucose	0,026 \pm 0,012 a	0,023 \pm 0,025 b	0,119 \pm 0,251 a	0,020 \pm 0,048 ab	/	0,003 \pm 0,006 a
Total	1,699 \pm 0,274	1,142 \pm 0,294	0,920 \pm 0,481	0,791 \pm 0,282	/	0,605 \pm 0,276

Les valeurs de concentrations en carbohydrates (saccharose, glucose et fructose) du nectar ont été traitées grâce à des tests de perMANOVA (Tableau 6) ainsi que par une visualisation des données par une ordination nMDS (Fig. 14).

Tableau 6. Résultats statistiques des différentes perMANOVA effectuées sur les données de concentration en carbohydrates. Ces données comportent d'une part les analyses réalisées sur la durée d'exposition ainsi que sur la catégorie de stress thermique.

Effet de la température d'exposition (21 °C, 24 °C, 27 °C)

Groupes	F	P
2 semaines	1,5528	0,11
1 mois	9,1384	0,001 ***

Effet de la durée d'exposition (2 semaines, 1 mois)

Groupes	F	P
21 °C (n=31)	5,4248	0,011 *
24 °C (n=49)	5,0667	0,014 *
27 °C	/	/

Nous pouvons constater que la température affecte de manière significative le profil en carbohydrates du nectar des plants d'*Impatiens glandulifera*. En plus de cela, la durée d'exposition est également associée à des différences significatives dans le profil des sucres analysés. Les groupes soumis à une température de 21°C et 24°C semblent donc influencé par la durée d'exposition à chacune de ces températures. Etant donné l'absence de répliques pour les plants exposés durant 1 mois à 27°C, aucun effet de la durée d'exposition sur la composition du nectar n'a pu être testé pour cette catégorie de stress thermique.

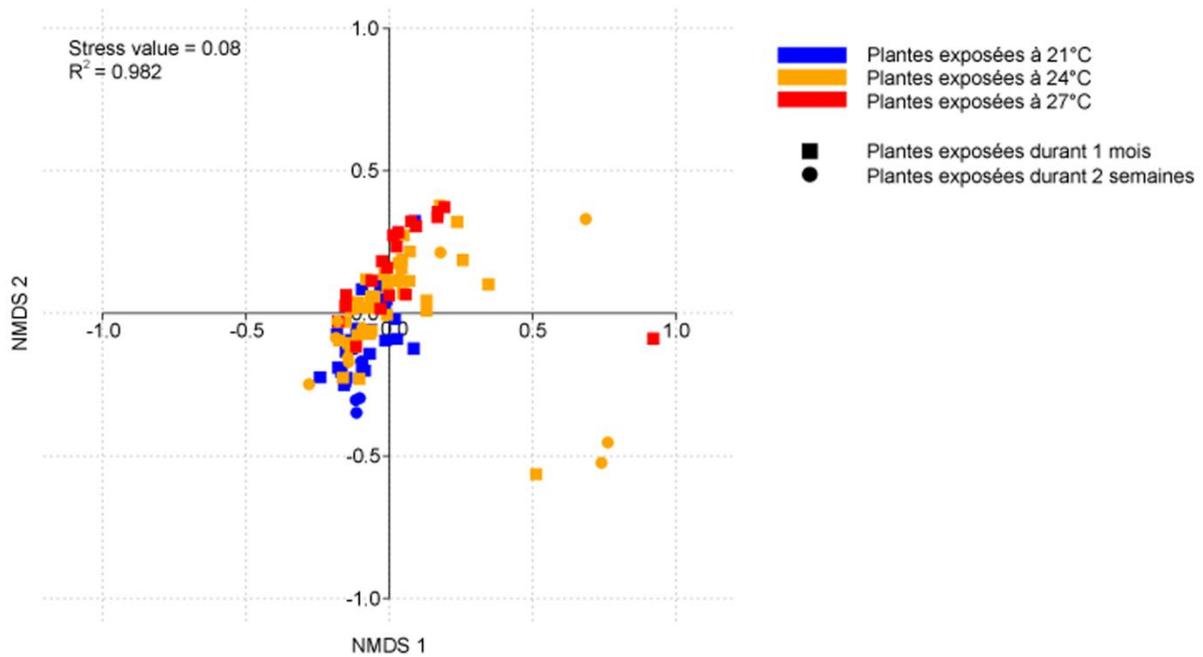


Figure 14: Ordination nMDS des groupes de plantes d'*Impatiens glandulifera* répartis selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). Ceci représente l'espace des individus. Chaque point représente un échantillon/réplica. Les distances reflètent la dissimilarité entre échantillons, plus la distance est grande plus la composition en carbohydrates est différente.

Les comparaisons multiples indiquent qu'une augmentation de la température influence de manière significative le profil en carbohydrates du nectar d'*Impatiens glandulifera* (Stress value = 0,08 ; $R^2 = 0,982$) (Fig. 14). Chaque comparaison entre les groupes soumis pendant un mois est significative ($p\text{-value} < 5\%$). Vu l'absence de données à 27°C pour une période de deux semaines d'exposition, cette série de plantes a été exclue des comparaisons multiples. L'ordination nMDS ne permet pas de visualiser de manière claire les différences détectées par ces différents tests. Suite à cette constatation une autre série de tests a été effectuée sur chacun des sucres considérés.

Une série d'ANOVA a été réalisée, lorsque les conditions d'applications étaient remplies, sur chacun des groupes de température. Chaque sucre a été étudié séparément parmi les différents groupes. Le tableau 7 reprend les valeurs associées à ces tests.

Des comparaisons multiples ont ensuite été effectuées sur chacun de ces groupes (tableau 7).

Tableau 7. Résultats statistiques des différentes comparaisons multiples effectuées sur les données de concentration en saccharose, fructose et glucose. Les données sont séparées selon la durée d'exposition.

Carbohydrate	Groupes comparés (1mois d'exposition)	<i>p-value</i>	Carbohydrate	Groupes comparés (2 semaines d'exposition)	<i>p-value</i>
Saccharose	21°C-24°C	0,0000527	Saccharose	21°C-24°C	0,065
	21°C-27°C	0,0000020		21°C-27°C	/
	24°C-27°C	0,2166464		24°C-27°C	/
Fructose	21°C-24°C	FALSE	Fructose	21°C-24°C	1,07e-05
	21°C-27°C	TRUE		21°C-27°C	/
	24°C-27°C	TRUE		24°C-27°C	/
Glucose	21°C-24°C	FALSE	Glucose	21°C-24°C	FALSE
	21°C-27°C	TRUE		21°C-27°C	/
	24°C-27°C	FALSE		24°C-27°C	/

Au vu des résultats statistiques obtenus, nous pouvons constater que la durée d'exposition du stress thermique influence le profil en carbohydrates du nectar des plantes d'*I. glandulifera*. En effet, la série de plantes soumise pendant un mois à stress thermique semble associée à des changements plus importants du profil en carbohydrates. Suite à une exposition de deux semaines, seul le fructose est associé à une différence significative et ce entre les groupes à 21°C et 24°C. La concentration en fructose étant dans ce cas bien moins importante parmi le groupe à 24°C (tableau 5).

Le groupe de plantes exposé durant un mois est clairement lié à des différences significatives dans les concentrations en carbohydrates. La concentration en saccharose est significativement plus élevée dans le groupe à 21°C en comparaison avec les deux autres catégories de température. Concernant la concentration en fructose, elle est significativement plus élevée dans les groupes à 21 et 24°C par rapport au groupe exposé à 27°C. la concentration inférieure de ce groupe se détache donc de celle des deux autres groupes, étant eux similaires. Enfin, en ce qui concerne la concentration en glucose, celle-ci est significativement différente uniquement entre les groupes à 21°C et 27°C, cette concentration étant inférieure dans ce dernier groupe.

3.2.2. Pollen

3.2.2.1. Teneur en polypeptides

Les résultats obtenus montrent que la teneur moyenne en polypeptides varie entre 21,4 et 27,87 mg/g de pollen lyophilisé pour tous les groupes considéré à l'exception d'un seul. Celui-ci est constitué par le groupe à 27°C exposé durant un mois. La température de culture des plantes influence significativement la concentration en polypeptides du pollen d'*Impatiens glandulifera*, le pollen des plantes cultivées à 27 °C présentant significativement moins de polypeptides que celui des plantes cultivées à 21 °C ($F = ; p = 0,033$) ou 24 °C ($F = ; p = 0,04$) (Tableau 8).

Cette différence est d'autant plus marquée que la durée du stress est importante ($F = 8,4131 ; p = 0,01$) (Tableau 8).

Tableau 8. Teneur en polypeptides des différents groupes d'*Impatiens glandulifera*, classés en fonction de la température et de la durée d'exposition. Les valeurs sont exprimées en mg/g sous forme moyenne \pm écart-type. Les résultats statistiques associés sont également renseignés. Les indices lettrés résultant des comparaisons multiples sont également indiqués. Les indices lettrés font référence aux comparaisons multiples paire par paire, deux valeurs partageant la même lettre ne différant pas significativement l'une de l'autre.

Durée d'exposition	Température d'exposition	Teneur en polypeptides (mg/g)	Résultats statistiques
2 semaines	21 °C (n=3)	21,56 \pm 3,63 b	<i>Température</i> F= 4,9808 $p = 0,02$ *
	24 °C (n=2)	27,87 \pm 5,90 b	
	27 °C (n=4)	23,26 \pm 6,97 b	
1 mois	21 °C (n=3)	25,07 \pm 7,32 b	<i>Durée</i> F= 8,4131 $p = 0,01$ *
	24 °C (n=2)	21,40 \pm 4,49 b	
	27 °C (n=4)	4,97 \pm 1,73 a	

3.2.2.2. Teneur en acides aminés

Au vu des données obtenues, la teneur en acides aminés du groupe exposé durant un mois à 27°C se détache toujours des autres, quel que soit la catégorie d'acide aminé. Les résultats des concentrations en acides aminés ont été traités par plusieurs tests statistiques. Des ANOVA à deux facteurs croisés (température et durée) ont été effectuées sur les données liées à la teneur en acides aminés totaux, en acides aminés essentiels, en glutamate et aspartate ainsi que la teneur en proline. Les teneurs moyennes en ces différents composés ainsi que le résultat des tests statistiques associés sont repris dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9. Concentrations en acides aminés des différents groupes de plantes d'*Impatiens glandulifera*, en fonction de la température et de la durée d'exposition. Les valeurs de concentrations sont exprimées en mg/g et présentées en tant que moyenne \pm écart-type. Les acides aminés analysés sont ici séparés en différentes catégories. Les résultats statistiques associés à chacun des tests effectués sur chaque catégorie sont représentés.

Durée d'exposition	Température d'exposition	Teneur en AAT (mg/g)	Teneur en AAE (mg/g)	Teneur en Glu et Asp (mg/g)	Teneur en proline (mg/g)
2 semaines	21 °C (n=6)	291,68 \pm 65,39 d	155,78 \pm 34,65 d	65,78 \pm 15,62 d	11,43 \pm 2,19 d
	24 °C (n=5)	267,07 \pm 12,32 cd	142,07 \pm 7,08 cd	59,57 \pm 2,09 cd	10,82 \pm 1,17 cd
	27 °C (n=6)	265,48 \pm 11,83 cd	140,47 \pm 6,64 cd	60,13 \pm 2,59 d	11,28 \pm 1,09 cd
1 mois	21 °C (n=5)	204,89 \pm 30,7 b	108,18 \pm 16,0 b	47,52 \pm 7,25 b	7,67 \pm 1,31 b
	24 °C (n=6)	221,69 \pm 17,53 bc	118,51 \pm 9,93 bc	49,41 \pm 3,23 bc	8,86 \pm 0,93 bc
	27 °C (n=6)	96,85 \pm 18,39 a	52,70 \pm 9,90 a	24,20 \pm 5,69 a	2,342 \pm 0,45 a
Résultats statistiques		<i>Température</i>	<i>Température</i>	<i>Température</i>	<i>Température</i>
		F = 35,076	F = 33,539	F = 3,783	F = 62,260
		p < 0,001 ***	p < 0,001 ***	p = 0,035 *	p < 0,001 ***
		<i>Durée</i>	<i>Durée</i>	<i>Durée</i>	<i>Durée</i>
	F = 121,766	F = 117,841	F = 68,602	F = 216,492	
	p < 0,001 ***	p < 0,001 ***	p = 0,000 ***	p < 0,001 ***	

Nous pouvons déduire que les deux facteurs étudiés (température et durée) sont liés à des différences statistiquement significatives parmi les groupes étudiés. En effet, les teneurs en acides aminés totaux, en acides aminés essentiels, en glutamate et aspartate, ainsi que la teneur en proline, semblent toutes influencées à la fois par la température et la durée d'exposition. Des tests de comparaisons multiples ont été menés sur chacune des teneurs reprises plus haut afin de détailler avec précision les différences détectées par chacune des ANOVA.

Concernant les valeurs de concentrations en acides aminés totaux, en acides aminés essentiels et en proline, les groupes ayant subi une température de 21°C et 27°C et ceux ayant subi une température de 24°C et 27°C sont significativement différents (pour les deux

comparaisons : p -value < 0.0001). De plus l'effet de la durée d'exposition semble mener à des différences significatives entre les groupes ayant été soumis à 21°C (p -value = 0.004) et 27°C (p -value < 0.0001).

Les teneurs en glutamate et aspartate estimées pour chacun des groupes sont statistiquement différentes entre le groupe à 21°C et celui à 27°C (p -value = 0.031). Les comparaisons multiples indiquent également que la durée d'exposition mène à des différences significatives dans la teneur en aspartate et glutamate pour les groupes de plantes ayant été soumis à 27°C.

Tableau 10. Composition en acides aminés essentiels des différents groupes de plantes (Moyenne ± écart-type). Ceux-ci ont été rassemblés par température et par durée d'exposition. Les résultats sont exprimés en mg/g de matière lyophilisée.

	21 °C		24 °C		27 °C	
	2 sem. (n=6)	1 mois (n=5)	2 sem. (n=5)	1 mois (n=6)	2 sem. (n=6)	1 mois (n=6)
Thréonine (mg/gr)	19,8 ± 4,3	13,3 ± 2,1	17,6 ± 0,8	14,8 ± 1,2	17,4 ± 0,79	5,5 ± 1,2
Valine	21,2 ± 5	14,4 ± 2,3	18,5 ± 0,6	15,8 ± 1,2	19,1 ± 0,6	8,2 ± 1,8
Méthionine	9,7 ± 2,8	6,2 ± 1,34	9,6 ± 0,9	8,0 ± 0,9	9,5 ± 0,8	4,1 ± 1,0
Isoleucine	18 ± 4	12,5 ± 2,0	17,2 ± 0,9	14,2 ± 1,2	14,2 ± 0,9	9,0 ± 1,7
Leucine	27,5 ± 6,3	19,0 ± 2,9	25,3 ± 0,9	21 ± 1,5	25,3 ± 0,9	10,6 ± 1,9
Phénylalanine	18,0 ± 3,7	12,2 ± 2,1	17,5 ± 1	14,1 ± 1,3	16,8 ± 1,1	9,3 ± 1,6
Histidine	17,7 ± 3,6	11,8 ± 1,9	14,5 ± 1,3	12,9 ± 1,1	13,9 ± 0,79	3,5 ± 0,8
Lysine	27,9 ± 6,4	19,0 ± 3,1	24,3 ± 0,98	20,83 ± 1,7	25,0 ± 0,9	6,2 ± 1,0
Arginine	18,6 ± 4	12,5 ± 2,2	17,6 ± 1,1	14,4 ± 1,5	17,1 ± 1,3	4,1 ± 0,6

La perMANOVA révèle que la composition en acides aminés essentiels du pollen diffère significativement en fonction de la température à laquelle les plantes sont cultivées ainsi qu'en fonction de la durée d'exposition (Tableau 11).

Tableau 11. Résultats statistiques associés aux perMANOVA effectuées sur les données des acides essentiels. Ces résultats sont classés selon la température et selon la durée d'exposition.

Effet de la température d'exposition (21 °C, 24 °C, 27 °C)

Groupes	F	P
2 semaines	1,0078	0,465 n.s.
1 mois	19,382	0,001 ***

Effet de la durée d'exposition (2 semaines, 1 mois)

Groupes	F	P
21°C	9,8632	0,007 **
24°C	17,084	0,01 **
27°C	110,12	0,004 **

Les comparaisons multiples ainsi que la visualisation des données indiquent qu'une augmentation de la température appauvrit de manière significative la teneur en acides aminés essentiels du pollen d'*Impatiens glandulifera* (Stress value = 0,01 ; $R^2 = 1$) (Fig. 15). Cet effet n'est cependant pas significatif pour les groupes de plantes exposés durant deux semaines ($F = 1,0078$; $p = 0,465$). L'ordination permet de visualiser le chevauchement des individus soumis aux stress thermiques durant deux semaines alors que les effets de température se démarquent clairement pour le pollen des plantes exposées durant un mois (données étalées le long de l'axe NMDS1) ($F = 19,382$; $p < 0,001$). Par ailleurs, le groupe soumis au stress le plus intense (i.e. 27 °C durant 1 mois) se détache bien des autres, indiquant un appauvrissement hautement significatif du pollen en acides aminés essentiels (Fig. 15).

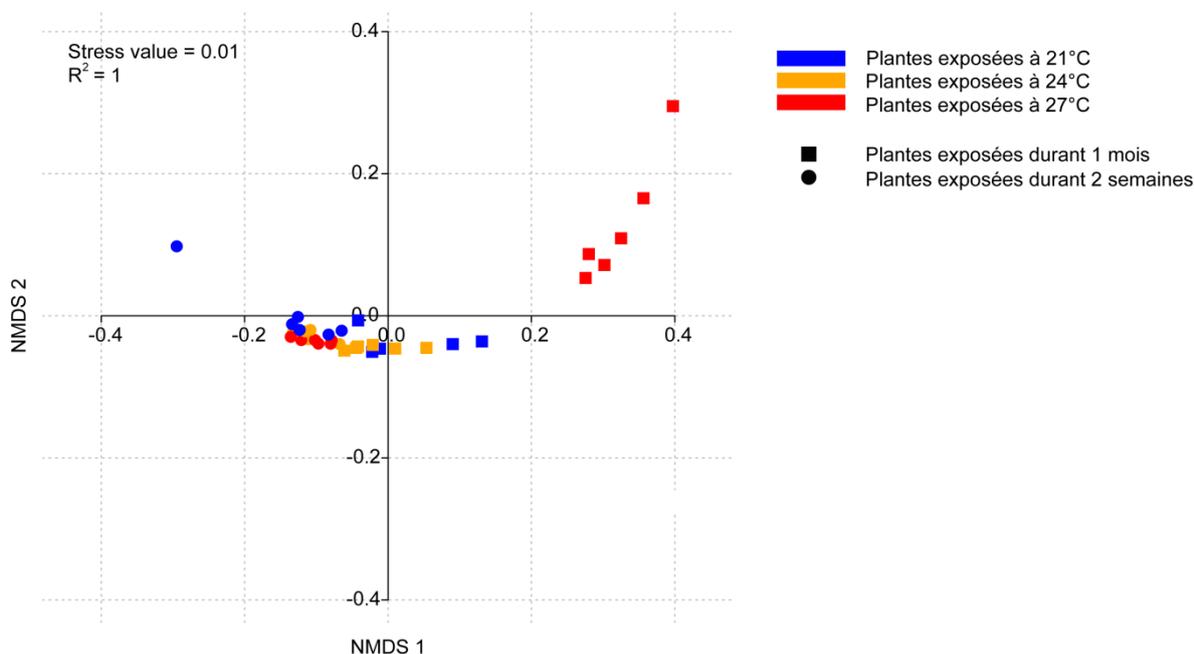


Figure 15 : Ordination nMDS des groupes de plantes d'*Impatiens glandulifera* répartis selon deux axes (NMDS 1 et NMDS 2). Au sein de l'espace des individus, chaque point représente un échantillon/réplica. Les distances reflètent la dissimilarité entre échantillons, plus la distance est grande plus la composition en acides aminés est différente. Les différents symboles font référence aux durées d'exposition (carré, 1 mois ; cercle, 2 semaines) alors que les couleurs figurent l'intensité du stress thermique (bleu, 21°C ; orange, 24°C ; rouge, 27°C).

3.3. Impact sur le comportement de récolte de *Bombus terrestris*

Les données obtenues, tout groupe confondu, montrent des valeurs de taux de visite comprises entre 0,4 et 16,66 fleurs/minute. Le temps de visite présente également des gammes de valeurs assez élargies, allant de 3,9 à 150 secondes/fleur. Nous voyons que le taux de visite moyen (avec ou sans présence de pelotes) est le plus bas pour le groupe à 21°C et le plus élevé pour le groupe à 27°C (Tableau 12). De la même manière, le temps de visite est le plus élevé pour le groupe à 21°C (avec ou sans pelotes), tandis que les deux autres catégories de température sont liées à des temps de visite moindres.

Tableau 12. Valeurs de taux et de temps de visite selon les différents groupes de température à laquelle les ouvrières de *Bombus terrestris* ont été exposées. Les taux de visite sont exprimés en fleurs par minute, les temps de visite en secondes par fleur. Les indices lettrés sont en lien avec les tests de comparaison multiple. Chaque lettre partagée indique une absence de différence significative.

Paramètre	Groupe	Moy ± sd
Taux de visite (avec pelotes)	21°C (n=31)	3,72 ± 1,68 fl/min a
	24°C (n=81)	5,52 ± 1,66 fl/min b
	27°C (n=21)	6,29 ± 3,27 fl/min b
Taux de visite (sans pelotes)	21°C (n=45)	2,97 ± 2,08 fl/min a
	24°C (n=35)	4,52 ± 2,13 fl/min b
	27°C (n=105)	4,71 ± 2,70 fl/min b
Temps de visite (avec pelotes)	21°C (n=31)	19,56 ± 10,02 sec/fleur b
	24°C (n=81)	11,88 ± 3,71 sec/fleur a
	27°C (n=21)	13,46 ± 9,60 sec/fleur a
Temps de visite (sans pelotes)	21°C (n=45)	32,17 ± 25,63 sec/fleur b
	24°C (n=35)	21,2 ± 18,32 sec/fleur a
	27°C (n=105)	19,11 ± 14,81 sec/fleur a

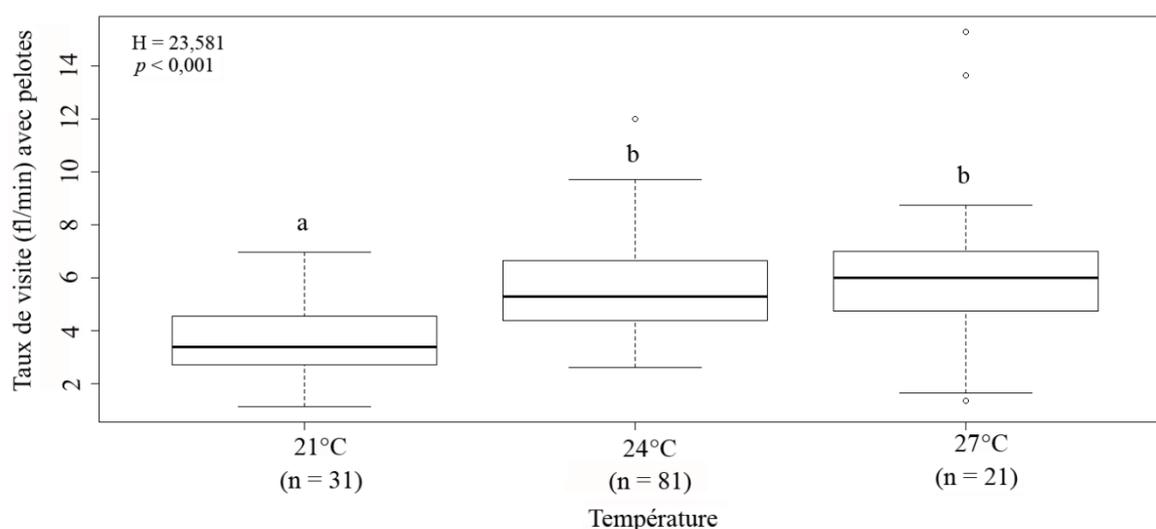


Figure 16 : boîtes de dispersion représentant le taux de visite (ouvrières avec pelotes) estimé en fonction du groupe de température (21°C-n = 31; 24°C-n= 81; 27°C-n= 21). Le taux de visite est exprimé en fleur par minute.

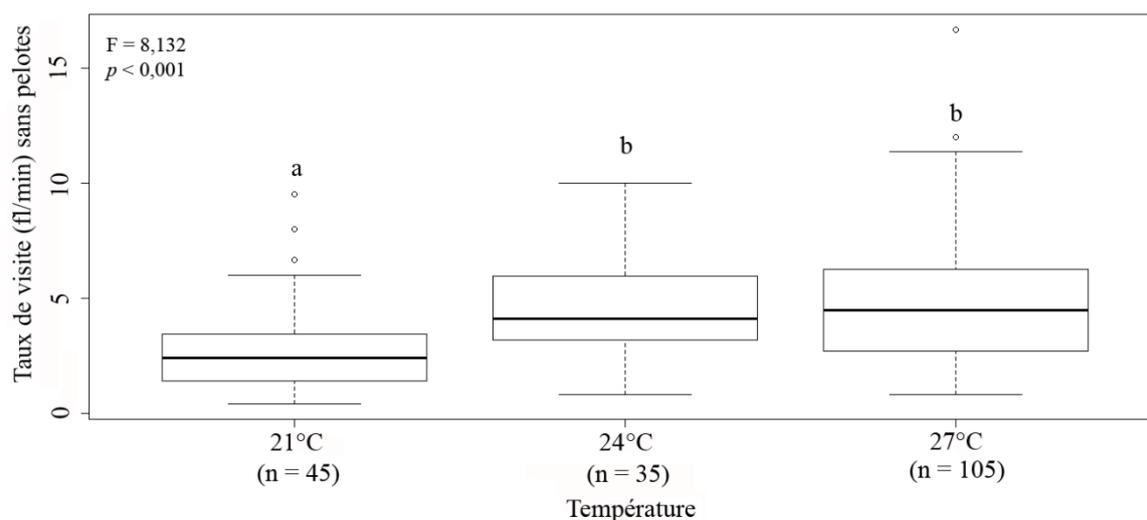


Figure 17 : boîtes de dispersion représentant le taux de visite (ouvrières sans pelotes) estimé en fonction du groupe de température (21°C-n = 45; 24°C-n = 35; 27°C-n =105). Le taux de visite est exprimé en fleur par minute.

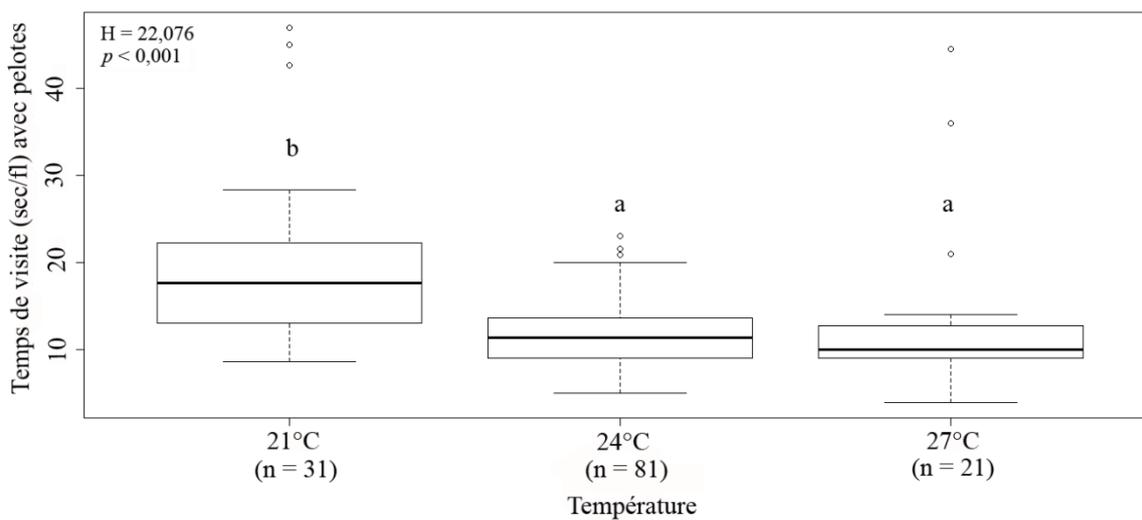


Figure 18 : boîtes de dispersion représentant le temps de visite (ouvrières avec pelotes) estimé en fonction du groupe de température (21°C-n = 31; 24°C-n = 81; 27°C-n = 21). Le temps de visite est exprimé en secondes par fleur.

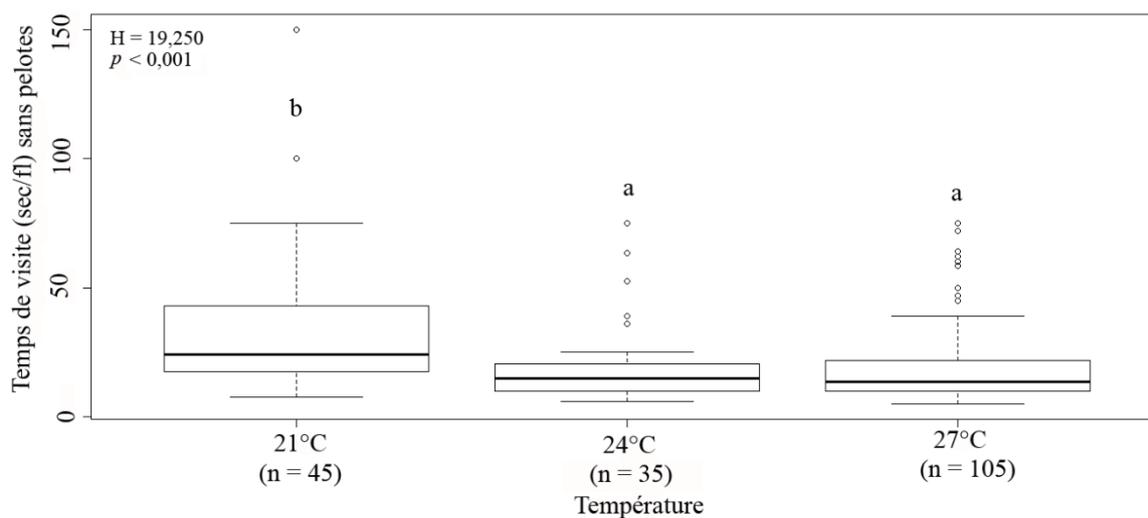


Figure 19 : boîtes de dispersion représentant le temps de visite (ouvrières sans pelotes) estimé en fonction du groupe de température (21°C-n = 45; 24°C-n = 35; 27°C-n = 105). Le temps de visite est exprimé en secondes par fleur.

Le taux et le temps de visite des ouvrières ont été analysés grâce à une ANOVA à 1 facteur (tableau 13). La variable explicative étant la température (21°C, 24°C ou 27°C). Lorsque les conditions d'application étaient remplies, une ANOVA à 1 facteur a pu être appliquée. Les comparaisons multiples effectuées sont représentées dans le tableau ci-dessous. Les valeurs obtenues pour les deux paramètres étudiés sont reprises dans le tableau 12 et permettent de visualiser les données récoltées, selon la présence ou non de pelotes de pollen, chez les ouvrières de *Bombus terrestris*.

Tableau 13. Résultats statistiques associés aux données relatives au taux et au temps de visite des ouvrières de *Bombus terrestris*. Les ANOVA ou Kruskal-Wallis effectués sont suivis par les résultats des tests de comparaison multiple effectué entre chaque catégorie de température. Les données de taux et de temps de visite ont été séparées selon la présence ou l'absence de pelotes.

Paramètre		F/H	p
Taux de visite	Avec pelotes (n=133)	H= 23,581	< 0,001***
	Sans pelotes (n=185)	F= 8,132	< 0,001***
Temps de visite	Avec pelotes (n=133)	H=22,0765	< 0,001***
	Sans pelotes (n=185)	H=19,2501	< 0,001***
Paramètre	Groupes comparés	p-value	
Taux de visite (avec pelotes)	21°C-24°C	TRUE	
	21°C-27°C	TRUE	
	24°C-27°C	FALSE	
Taux de visite (sans pelotes)	21°C-24°C	0,0159	
	21°C-27°C	0,0003	
	24°C-27°C	0,916	
Temps de visite (avec pelotes)	21°C-24°C	TRUE	
	21°C-27°C	TRUE	
	24°C-27°C	FALSE	
Temps de visite (sans pelotes)	21°C-24°C	TRUE	
	21°C-27°C	TRUE	
	24°C-27°C	FALSE	

Au vu des résultats statistiques obtenus, nous pouvons constater que la température influence de manière significative les paramètres comportementaux étudiés. Des comparaisons multiples des moyennes, telles qu'indiquées plus haut, nous montrent qu'il existe des différences statistiquement significatives entre les groupes à 21°C et 24°C, et entre ceux à 21°C et 27°C. Les différences constatées se situent au niveau des mêmes groupes pour le taux (Fig.16 et 17) et le temps de visite (Fig. 18 et 19). De plus, la présence ou l'absence de pelotes de pollen mènent aux mêmes constatations pour les deux paramètres.

4. Discussion

4.1. Impact de la température sur la morphologie d'*Impatiens glandulifera*

La comparaison des facteurs de croissance a révélé une différence significative concernant la longueur des feuilles de cette espèce. Les individus d'*Impatiens glandulifera* des groupes à 21°C et 27°C diffèrent au niveau de la croissance des feuilles, le groupe à 27°C ayant une croissance moins importante.

Les effets négatifs d'un stress thermique sur la croissance végétale ont déjà été démontrés dans de nombreuses études. Ce stress thermique est compris ici comme étant une température élevée appliquée au cours d'une période plus ou moins longue. Une hauteur végétale réduite fait par exemple partie des conséquences possibles engendrées par un stress thermique important (Prasad *et al.*, 2006). De la même manière, des conditions de stress hydrique (i.e. sécheresse) peuvent provoquer des changements au niveau foliaire tel qu'une réduction du nombre de feuilles, un ratio de croissance réduit ainsi qu'une taille finale réduite des feuilles. Sous un stress sévère, le ratio d'élongation foliaire peut diminuer et la croissance des feuilles s'arrêter totalement. En plus de cela, ce stress peut mener à une surface foliaire totale diminuée à cause de la formation réduite de nouvelles feuilles (Prasad *et al.*, 2008). Des conditions de sécheresse peuvent également provoquer une sénescence accrue des feuilles (de Souza *et al.*, 1997) et conduire à la mort des tissus foliaires, résultant en une chute des feuilles, plus particulièrement des feuilles plus âgées.

Les conséquences d'un stress thermique semblent donc, de manière générale, être opposées à celles liées à des conditions de sécheresse. En effet, des températures élevées peuvent mener à un nombre de feuilles plus important (Prasad *et al.*, 2006). Les ratios d'allongement des feuilles peuvent augmenter tout en ayant une durée d'élongation diminuée (Bos *et al.*, 2000). Il est à noter que les conséquences précises d'un stress thermique sur la surface foliaire et sa dynamique restent encore à étudier (Prasad *et al.*, 2008). L'impact d'un stress hydrique et d'un stress thermique peuvent se manifester par une croissance cellulaire moindre et par une hauteur moins importante des plantes. L'impact combiné de ces deux facteurs est peu étudié mais ils semblent, de par les mécanismes différentiels impliqués, s'additionner.

Au vu de la littérature et des résultats significatifs obtenus concernant la longueur des feuilles, plusieurs constatations peuvent être faites. Tout d'abord nous voyons que des

conditions de stress hydrique peuvent mener à une croissance moindre et à une taille des feuilles moindre, *a contrario* d'un stress thermique pouvant mener à une croissance plus importante des feuilles. Or les résultats obtenus démontrent de manière claire qu'une température de 27°C provoque un taux de croissance bien moindre par rapport à des températures plus faibles. Nous pouvons donc faire légitimement l'hypothèse que les résultats obtenus chez ce groupe d'*Impatiens glandulifera* sont dus, au moins en partie, à un stress hydrique important, en plus de la température élevée à laquelle ce groupe était soumis. En effet, au cours des expériences menées, malgré un arrosage le plus régulier possible (5 fois/semaine au maximum), le groupe soumis à 27°C était rapidement déshydraté (observation personnelle). Les résultats obtenus sont donc probablement dus à une superposition des effets causés par une température élevée (27°C), mais également par un stress hydrique certain.

4.2. Impact de la température sur les ressources florales d'*Impatiens glandulifera*

4.2.1. Le nectar

Les analyses effectuées nous indiquent que les groupes de plantes ayant subi deux semaines de stress thermique aux 3 températures mentionnées, présentent une différence dans la concentration en saccharose du nectar. Le groupe soumis à 24°C possède un pourcentage Brix (lié au saccharose) inférieur à celui de 21°C. Une étude menée sur l'espèce *Trifolium repens* a déjà démontré qu'une température élevée, mais nocturne dans ce cas précis, pouvait mener à un nectar moins riche en saccharose (Jakobsen & Kristjansson, 1994). Il est à noter que ceci se fait au bénéfice du fructose et du glucose qui deviennent tous les deux plus abondants.

Le profil en carbohydrates du groupe de plantes ayant subi un stress thermique durant un mois est caractérisé par une concentration en saccharose plus importante pour le groupe ayant été soumis à une température de 21°C. Ceci confirme les résultats obtenus par réfractométrie mentionnés ci-dessus. L'étude de Jakobsen & Kristjansson (1994) vient ici aussi conforter ces résultats. *A contrario*, le groupe de plantes ayant été soumis durant deux semaines aux températures évoquées précédemment, présente une concentration en fructose et en glucose moins importante pour le groupe à 27°C. Ces résultats en apparence contradictoires avec ceux obtenus pour la série de plantes exposée durant un mois pourraient néanmoins refléter l'influence certaine de la température sur le profil en carbohydrates du

nectar. Il est à noter que la différence de concentration en saccharose du nectar détectée par réfractométrie ne se retrouve pas dans l'étude du profil en carbohydrates.

Une autre étude (Carroll *et al.*, 2000) montre quant à elle, que suite à des conditions de sécheresse (stress hydrique), le volume de nectar change de manière significative par rapport aux groupes comparés tandis que la concentration en carbohydrates (saccharose) ne change pas. Ces réponses opposées à celles obtenues dans ce mémoire, reflètent sans aucun doute les réponses contradictoires obtenues suite à l'application d'un stress hydrique (cas de l'étude de Carroll *et al.*, 2000) et d'un stress thermique (cas du présent travail).

Il semble n'y avoir aucune autre étude disponible concernant l'impact de températures élevées sur la composition du nectar, et plus particulièrement sur le profil en carbohydrates de celui-ci.

4.2.2. Le pollen

Le groupe d'individus d'*Impatiens glandulifera* ayant subi pendant un mois une température de 27°C présente une teneur en polypeptides quatre à cinq fois moindre par rapport à tous les autres groupes. La littérature scientifique ne semble présenter aucune étude sur l'impact éventuel de températures élevées sur la concentration en polypeptides. Par contre, diverses études ont mesuré l'impact de telles températures sur la teneur globale en protéines. L'étude de Tang *et al.* (2007) montre par exemple que le taux de protéines solubles est drastiquement plus petit lorsqu'une température élevée est d'application (39°C, 4h/jour). Cette étude a été réalisée en phytotrons en utilisant comme modèle végétale *Oryza sativa* (Poaceae). Elle démontre également que plus la durée d'exposition est importante, plus la quantité de protéines solubles est petite. Notre étude confirme donc ces résultats pour une plante entomophile.

La quantité d'acides aminés totaux du groupe ayant été soumis pendant un mois à une température de 27°C est jusqu'à trois fois inférieure aux autres groupes. Il en est de même pour la quantité d'acides aminés essentiels, pour la proline ainsi que pour le couple glutamate-aspartate. L'étude de Tang *et al.* (2007) citée précédemment s'est penchée sur la quantité d'un seul acide aminé, par ailleurs non essentiel, qu'est la proline. Elle démontre que plus la durée d'exposition est importante plus la quantité de proline libre contenue dans les anthères est petite. Ceci étant de nouveau lié à une température d'exposition très élevée (39°C). Une autre étude mettant déjà en évidence que la quantité de proline libre diminuait sous des conditions de stress thermique, soulevait une hypothèse pour expliquer cette diminution (Mutters *et al.*,

1989) : le transfert de la proline de la paroi des anthères vers le pollen serait inhibée par les hautes températures.

Il est à remarquer que l'impact de la température sur la composition chimique du pollen et sur l'ensemble de cet élément reproducteur mâle dépend très certainement de chaque espèce végétale et que ce stress thermique affecte à la fois les fonctions mâles et femelles impliquées dans la reproduction (Hedhly *et al.*, 2008). Ces hautes températures peuvent également affecter le développement des grains de pollen. Lorsqu'elles sont appliquées avant l'anthèse, elles peuvent provoquer une stérilité du pollen (Erickson & Markhart, 2002). Toujours en lien avec ces températures élevées, un développement précoce du stock de fruits ou encore une inhibition de la fertilisation peuvent se dérouler lorsqu'elles sont d'application après la pollinisation (Erickson & Markhart, 2002).

En plus de l'impact causé par la température sur la composition chimique du pollen, des changements développementaux et des irrégularités de l'épiderme peuvent apparaître suite à un stress thermique durant les semaines précédant l'anthèse (Sato *et al.*, 2002). Durant les expériences menées sur les plants d'*Impatiens glandulifera*, des anthères irrégulières indéhiscents ont été observées chez les plantes du groupe soumis pendant un mois à 27°C (observation personnelle). L'étude de Porch & Jahn (2001) a démontré qu'un stress thermique pouvait mener à des irrégularités au niveau de la paroi des anthères, lesquelles peuvent devenir indéhiscents. De plus, une viabilité moindre du pollen a également été observée dans cette étude. L'application prolongée des gammes de température durant les expériences menées sur les plants d'*Impatiens glandulifera* se trouve ici renforcée par cette sensibilité probable durant les semaines précédant la formation du pollen.

4.3. Impact de la température sur le comportement de visite de *Bombus terrestris*

Le taux et le temps de visite des ouvrières de *Bombus terrestris* présentent des différences entre les trois gammes de températures évoquées, le taux de visite étant plus élevé pour les groupes à 24°C et 27°C par rapport à celui à 21°C. Le temps de visite étant lié de manière inverse à ce paramètre, les groupes à 24°C et 27°C présentent des valeurs moins élevées que le groupe à 21°C. Des changements de comportement causés par des températures élevées sont répertoriés dans la littérature.

L'étude de Peat & Goulson (2005) démontre tout d'abord l'importance des paramètres climatiques et en particulier de la température sur le comportement de récolte de l'espèce *Bombus terrestris*. Les ouvrières étudiées au cours de cette étude récoltaient de manière claire plus de pollen lorsque les journées étaient chaudes et sèches. *A contrario*, la récolte de nectar se déroulait de préférence en début et fin de journée et lorsque l'humidité était plus importante.

Bien que ne concernant pas le comportement à proprement parler, deux études ont mis en avant l'importance du climat et de la température sur le cycle de vie des bourdons. En effet, Iserbyt & Rasmont (2012) ont démontré que les températures estivales élevées (durant la fondation des colonies) étaient corrélées avec une faible abondance de toutes les espèces de bourdon dans les Pyrénées-Orientales. De plus, l'impact de températures très élevées durant les mois d'été (i.e. phases de canicule) semble également lié à des chutes de l'abondance de la faune de bourdons (Rasmont & Iserbyt, 2012).

4.4. Impact de la température sur la relation *Bombus terrestris* - *Impatiens glandulifera*

Au vu des résultats obtenus d'une part pour les taux et les temps de visite, et d'autre part pour la composition chimique du pollen et du nectar ; plusieurs hypothèses peuvent être soulevées sur la relation *Bombus terrestris* – *Impatiens glandulifera*. Le taux de visite des ouvrières de *Bombus terrestris* étant plus important à température élevée (et moindre pour le temps de visite), une première explication possible est liée à la température elle-même. En effet, l'influence directe de la température pourrait avoir un impact sur ce changement de comportement, les ouvrières de cette espèce s'adaptant à des températures plus élevées par une augmentation du taux de visite (et donc par une diminution du temps de visite). Ceci a déjà été observé par Heinrich (1973 ; 1974), lequel avait déjà constaté que lorsque la température ambiante était élevée, les ouvrières du genre *Bombus* consacraient moins de temps aux visites florales.

Une deuxième explication envisageable concerne la qualité nutritionnelle du pollen et/ou du nectar. En effet, au vu des résultats obtenus, il semble que la qualité nutritionnelle du nectar d'une part (avec une concentration en saccharose inférieure à température élevée) et du pollen d'autre part (avec une teneur en acides aminés essentiels et en polypeptides inférieure à haute température) puissent être liées aux changements de comportement de visite observés.

Cette qualité chimique moindre des récompenses florales a été clairement établie pour le groupe d'*Impatiens glandulifera* exposé aux différentes gammes de température durant un mois. Or les plantes mises à disposition des ouvrières de *B. terrestris* ont été exposées aux trois températures mentionnées durant deux semaines et ne semblent pas liées, du moins de manière significative, à un pollen de moindre qualité. Le nectar semble quant à lui influencé de manière statistiquement significative au niveau du fructose, celui-ci étant moins abondant dans le groupe à 24°C. Néanmoins, au vu des résultats statistiques nous suggérant une influence de la durée d'exposition sur la qualité des récompenses florales (au niveau de tous les composés chimiques envisagés), il se peut que les analyses effectuées n'aient pas une sensibilité suffisante pour détecter une qualité nutritionnelle moindre, laquelle est clairement observable lorsque la durée d'exposition des plantes de cette espèce est prolongée.

L'étude de Hoover *et al.*, (2012) a démontré de manière claire que la qualité des récompenses florales, et en particulier du nectar, pouvait avoir un impact sur le comportement de visite de l'espèce *Bombus terrestris*. Le nectar et plus particulièrement sa concentration en sucres constitue un élément important dans le choix floral des bourdons tels que *Bombus impatiens* dont les ouvrières préféreraient largement un nectar fortement concentré en sucres par rapport à un nectar abondant en terme de volume mais peu concentré (Cnaani *et al.*, 2006)).

De plus, la qualité nutritionnelle du pollen (en termes de protéines) est associée de manière incontestable à des préférences alimentaires chez les diverses espèces de bourdons existantes (Hanley *et al.*, 2008). La teneur en acides aminés et en particulier en acides aminés essentiels du pollen est également indispensable ainsi que, semble-t-il, la teneur en polypeptides (Cohen, 2004 ; Vanderplanck *et al.*, 2014). Au niveau du nectar, les bourdons sont attirés de manière claire vers les espèces de plantes présentant un nectar riche en saccharose (Baker & Baker, 1983). Toutes ces caractéristiques montrent bien l'importance primordiale de la qualité des récompenses florales, lesquelles peuvent être altérées comme semble le montrer ce présent travail.

Al-Ghzawi *et al.* (2009) ont montré qu'un autre facteur important, le stress hydrique, pouvait influencer une relation plante pollinisateur (*Trigonella moabitica* et *Apis mellifera*). En effet, dans cette étude, les plantes soumises à un stress hydrique important étaient moins visitées par les ouvrières d'*Apis mellifera*. Ceci était de plus associé à une quantité de pollen viable amoindrie. Une autre étude menée chez *Anthophora plumipes* a montré un lien existant entre la température ambiante et la collecte de récompenses florales (pollen et nectar). Plus la température ambiante était élevée plus le transport de pollen et de nectar par les femelles était

important (Stone, 2008). La variation dans les niveaux d'activité de butinage ne dépendait pas seulement de la température mais également de la qualité des récompenses florales.

4.5. Impact du réchauffement climatique sur la conservation des interactions plantes-pollinisateurs

Nous voyons que le réchauffement climatique, par l'augmentation des températures, pourrait avoir un impact sur les relations plantes-pollinisateurs comme suggéré par les résultats de ce travail de fin d'études ainsi que par la littérature. Différentes espèces de pollinisateurs ainsi que certaines espèces de plantes pollinisées semblent être affectées par des températures élevées. Cependant, l'influence exacte du réchauffement climatique sur les interactions entre plantes et pollinisateurs est encore peu connue. De plus, les réponses à ce phénomène semblent dépendre des espèces considérées, la conservation de ces relations étant très probablement différente selon le degré de spécialisation de chaque espèce (Willmer, 2012).

5. Conclusion

Les résultats obtenus au cours de ce travail de fin d'études semblent corroborer l'idée que le réchauffement climatique puisse avoir un impact sur la flore et sur la faune pollinisatrice, ainsi que sur le réseau de pollinisation les reliant. L'impact potentiel du changement climatique est ici envisagé par un seul paramètre, c'est-à-dire la température. L'étude simplifiée de ce paramètre, en utilisant plusieurs gammes de températures appliquées de manière continue, nous a permis d'établir plusieurs constatations.

Tout d'abord, d'un point de vue végétal, une température de 27°C appliquée durant une période d'un mois semble avoir un impact sur la croissance de l'espèce *Impatiens glandulifera*, la croissance foliaire étant moins importante à cette température. Ensuite, la concentration et la composition en sucres du nectar semblent également modifiées suite à l'application de cette température importante. La concentration en saccharose semble être moindre à température élevée lorsque les plantes sont exposées au stress durant un mois. Durant une exposition moins importante, le profil en carbohydrates semble également associé à des changements de la concentration en sucres. Le fructose et le glucose semblent dans ce cas plus importants.

De plus, l'application de cette température de 27°C durant une période d'un mois semble mener à un pollen de moindre qualité chez cette espèce, celui-ci étant significativement moins riche en acides aminés totaux et en polypeptides. En résumé, du point de vue de l'espèce végétale considérée, cette température élevée est liée à des récompenses florales de moindre qualité.

Enfin, cette température semble être liée chez l'espèce *Bombus terrestris*, à un comportement de collecte différent. De manière simplifiée, plus la température est élevée plus le taux de visite est important chez les ouvrières de cette espèce, et plus le temps consacré à chaque fleur est petit.

Les résultats obtenus sur les deux espèces précitées ne permettent cependant pas de discriminer l'impact direct de la température sur le comportement de récolte de *Bombus terrestris* sur *Impatiens glandulifera* d'un éventuel impact indirect causé par des récompenses florales de qualité moindre.

6. Perspectives

Au vu des expériences menées et des résultats récoltés, différentes améliorations pourraient être envisagées. Tout d'abord, en ce qui concerne l'impact potentiel de la température sur la relation plante-pollinisateur (*B. terrestris*/*I. glandulifera*), un protocole impliquant des traitements croisés pourrait être établi. Des plants d'*Impatiens* élevés durant un mois à 27°C seraient par exemple présentés aux ouvrières de l'espèce *terrestris* dans une salle climatisée maintenue à 21°C.

Ceci permettrait de discriminer de manière optimale l'impact de la température de la qualité amoindrie des récompenses florales. Les ouvrières pourraient également être exposées à des plantes élevées durant au moins un mois sous les températures citées, afin de les exposer à des récompenses florales de qualité significativement moindre.

De plus, afin de mieux coller aux conditions *in natura*, des gradients de température pourraient être appliqués aux plantes de cette espèce. Une exposition prolongée à des températures élevées (variant par exemple de 27°C à 32°C de jour et de 18°C à 23°C de nuit) sous ces conditions pourrait refléter de manière plus réaliste l'impact éventuel du réchauffement climatique sur les relations plantes pollinisateurs et en particulier sur les deux espèces susmentionnées.

Bibliographie

- Aloni B., Peet M., Pharr M. & Karni L., 2001.** The effect of high temperature and high atmospheric CO₂ on carbohydrate changes in bell pepper (*Capsicum annuum*) pollen in relation to its germination. *Physiologia Plantarum* 112 : 505–512.
- Al-Ghzawi A.-M., Zaitoun S., Gosheh H. & Alqudah A., 2009.** Impacts of drought on pollination of *Trigonella moabitica* (Fabaceae) via bee visitations. *Archives of Agronomy and Soil Science* 55 (6): 683-692.
- Baker H.G. & Baker I., 1983.** A brief historical review of the chemistry of floral nectar. In: Bentley, B., Elias, T. (Eds.), *The Biology of Nectaries*. Columbia University Press, New York, pp. 126–152.
- Bale J.S. & Hayward S.A.L., 2010.** Insect overwintering in a changing climate. *The Journal of Experimental Biology* 213: 980–994.
- Barrow D.A. & Pickard R.S., 1984.** Size-related selection of food plants by bumblebees. *Ecological Entomology* 9: 369-373.
- Bartomeus I., Ascher J.S., Wagner D., Danforth B.N., Colla S., Kornbluth S. & Winfree R., 2011.** Climate-associated phenological advances in bee pollinators and bee-pollinated plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.1115559108 108
- Beerling D.J. & Perrins J.M., 1993.** *Impatiens glandulifera* Royle (*Impatiens roylei* Walp.). *Journal of Ecology* 81: 367-382.
- Biesmeijer J.C., Roberts S.P.M., Reemer M., Ohlemuller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A.P., Potts S.G., Kleukers R., Thomas C.D., Settele J. & Kunin W.E., 2006.** Parallel declines in Pollinators and Insect-Pollinated Plants in Britain and the Netherlands. *Science* 313: 351-354.
- Bjerknes A.L., Totland O., Hegland S.J. & Nielsen A., 2007.** *Biological Conservation* 138: 1–12.
- Bos H.J., Tijani-Eniola T. & Struik P.C., 2000.** Morphological analysis of leaf growth of maize: Responses to temperature and light intensity. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 48:181–198.

- Brodie J., Post E. & Laurance W.F., 2012.** Trends in Ecology and Evolution, 27(3).
- Buchholz S., Rolfmeyer D. & Schirmel J., 2013.** Simulating small-scale climate change effects-lessons from a short-term field manipulation experiment on grassland arthropods. Insect Science 20 : 662-670.
- Cane J.H. & Sipes S., 2006.** Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and a revised lexicon for oligolecty. University of Chicago Press, 108-155.
- Carroll B., Pallardy S.G. & Galen C., 2001.** Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (onagraceae). American Journal of Botany 88(3): 438–446.
- Chittka L. & Schürkens S., 2001.** Successful invasion of a floral market, An exotic Asian plant has moved in on Europe's river-banks by bribing pollinators. Nature 411: 653.
- Clements D.R., Feenstra K.R., Jones K. & Staniforth R., 2008.** Canadian Journal of Plant Science 88: 403-417.
- Cnaani J., Thomson J.D. & Papaj D.R., 2006.** Flower Choice and Learning in Foraging Bumblebees: Effects of Variation in Nectar Volume and Concentration. Ethology 112 : 278–285.
- Cohen A.C., 2004.** *Insect Diet: Science and Technology*.CRC.
- de Souza P.I., Egli D.B. & Buening W.P., 1997.** Water stress during seed filing and leaf senescence in soybean. Agronomy Journal 89 : 807–812.
- Erickson A.N. & Markhart A.H., 2002.** Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. Plant, Cell and Environment 25: 123–130.
- Eyre M.D., Rushton S.P., Luff M.L. & Telfer M.G., 2005.** Investigating the relationships between the distribution of British ground beetle species (Coleoptera, Carabidae) and temperature, precipitation and altitude. Journal of Biogeography 32: 973–983.
- Farré-Armengol G., Filella I., Llusia J. & Penuelas J., 2013.** Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 15: 56-67.
- Feynman J., 2007.** Has solar variability caused climate change that affected human culture? Advances in Space Research 40: 1173–1180.

- Firon N., Shaked R. , Peet M.M. , Pharr D.M. , Zamski E. , Rosenfeld K. , Althan L. & Pressman E., 2006.** Pollen grains of heat tolerant tomato cultivars retain higher carbohydrate concentration under heat stress conditions. *Scientia Horticulturae* 109: 212–217.
- Giannini T.C., Acosta A.L., Garófalo C.A., Saraiva A.M., Alves-dos-Santos I. & Imperatriz-Fonseca V.L., 2012.** Pollination services at risk: Bee habitats will decrease owing to climate change in Brazil. *Ecological Modelling* 244: 127– 131.
- Goulson D., 2010.** Bumblebees Behaviour, ecology and conservation. Oxford Biology, second edition.
- Hanley, M.E., Franco, M., Pichon, S., Darvill, B. & Goulson D., 2008.** Breeding system, pollinator choice and variation in pollen quality in British herbaceous plants. *Functional Ecology* 22: 592–598.
- Hedhly A., Hormaza J.I. & Herrero M., 2008.** Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science* 14 (1): 30-36.
- Hedhly A., Hormaza J.I., & Herrero M., 2004.** Effect of Temperature on pollen tube kinetics and dynamics in sweet cherry, *Prunus avium* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 91: 558–564.
- Hegland S.J., Nielsen A., Lazaro A., Bjerknes A-L. & Totland O., 2009.** How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* 12: 184–195.
- Heinrich B., 1972.** Physiology of brood incubation in the bumblebee queen, *Bombus vosnesenskii*. *Nature* 239 : 223-225.
- Heinrich B., 1973.** Mechanisms of insect thermoregulation. In weiser, W. (ed.), *Effects of temperature on ectothermic organisms*. Springer-Verlag, Berlin.
- Heinrich B., 1974.** Thermoregulation in endothermic insects. *Science* 185:747-756.
- Holzschuh A, Dewenter I. & Tscharntke T., 2008.** Agricultural landscapes with organic crops support higher pollinator diversity. *Oikos* 117: 354-361.
- Hoover S.E.R., Ladley J.J., Shchepetkina A.A., Tisch M., Gieseg S.P. & Tylianakis J.M., 2012.** Warming, CO₂, and nitrogen deposition interactively affect a plant-pollinator mutualism. *Ecology Letters* 15: 227–234.

Inoue M.N., Yokoyama J. & Washitani I., 2008. Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation* 12: 135–146.

Iserbyt S. & Rasmont P., 2012. The effect of climatic variation on abundance and diversity of bumblebees: a ten years survey in a mountain hotspot. *Annales de la Société Entomologique de France* 48 (3–4) : 261-273.

Jakobsen H.B. & Kristjansson K., 2004. Influence of Temperature and Floret Age on Nectar Secretion in *Trifolium repens* L. *Annals of Botany* 74: 327-334.

Janssens S.B., Knox E.B., Huysmans S., Smets E.F. & Merckx V.S.F.T., 2009. Rapid radiation of Impatiens (Balsaminaceae) during Pliocene and Pleistocene: Result of a global climate change. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 806–824.

Keller C.F., 2004. 1000 Years of climate change. *Advances in Space Research* 34, 315–322.

Kevan P.G., Greco C.F. & Belaoussoff S., 1997. Lognormality of biodiversity and abundance in diagnosis and measuring of ecosystemic health: pesticide stress on pollinators on blueberry heaths. *Journal of Applied Ecology* 34: 1122–1136.

Klein, A.-M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen C. & Tshartnke T., 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274 : 303-313.

Klein D. & Raemakers I., 2008. A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89 : 1811-1823.

Kleinbauer I., Dullinger S., Peterseil J. & Essl F., 2010. Climate change might drive the invasive tree *Robinia pseudacacia* into nature reserves and endangered habitats. *Biological Conservation* 143: 382–390.

Koti S., Reddy K. R., Kakani V.G., Zhao D. & Gao W., 2007. Effects of carbon dioxide, temperature and ultraviolet-B radiation and their interactions on soybean (*Glycine max* L.) growth and development. *Environmental and Experimental Botany* 60: 1–10.

Kraus, B. & Page R.E., 1995. Effect of *Varroa jacobsoni* (Mesostigmata: Varroidae) on feral *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in California. *Environmental Entomology* 24: 1473-1480.

- Memmott J., Carvell C., Pywell R.F. & Craze P.G., 2010.** The potential impact of global warming on the efficacy of field margins sown for the conservation of bumble-bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological sciences* 365: 2071–2079.
- Mutters R.G., Ferreira L.G.R. & Hall A.E., 1989.** Proline Content of the Anthers and Pollen of Heat-Tolerant and Heat-Sensitive Cowpea Subjected to Different Temperatures. doi:10.2135/cropsci1989.0011183X002900060036x.
- Nava G.A., Dalmago G.A., Bergamaschi H., Paniz R., Pires dos Santos R. & Marodin G.A.B., 2009.** Effect of high temperatures in the pre-blooming and blooming periods on ovule formation, pollen grains and yield of ‘Granada’ peach. *Scientia Horticulturae* 122: 37–44.
- Ollerton J., Winfree R. & Tarrant S., 2011.** How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Osborne J.L., Martin A.P., Shortall C.R., Todd A.D., Goulson D., Knight M.E., Hale R.J. & Sanderson R.A., 2008.** Quantifying and comparing bumblebee nest densities in gardens and countryside habitats. *Journal of Applied Ecology*, doi: 10.1111/j.1365-2664.2007.01359.x
- Peat J. & Goulson D., 2005.** Effects of experience and weather on foraging rate and pollen versus nectar collection in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Behaviour Ecology Sociobiology* 58:152-156.
- Porch T.G. & Jahn M., 2001.** Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. *Plant, Cell and Environment* 24: 723–731.
- Potts S.G., Biesmeijer J.C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O. & Kunin W.E., 2010.** Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 25 (6): 345-353.
- Prasad P.V.V., Boote K.J., Hartwell Allen Jr L. & Thomas J. M. G., 2002.** Effects of elevated temperature and carbon dioxide on seed-set and yield of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Global Change Biology* 8: 710-721.
- Prasad P.V.V., Boote K.J., & Allen, Jr L.H., 2006.** Adverse high temperature effects on pollen viability, seed-set, seed yield and harvest index of grain sorghum [*Sorghum bicolor* (L.)

Moench] are more severe at elevated carbon dioxide due to higher tissue temperatures. *Agricultural and Forest Meteorology* 139: 237–251.

Prasad P.V.V., SStaggenborg S.A. & Z. Ristic Z., 2008. Impacts of Drought and/or Heat Stress on Physiological, Developmental, Growth, and Yield Processes of Crop Plants. ASA, CSSA, SSSA, 677 S. Segoe Rd., Madison, WI 53711, USA. Response of crops to limited water: Understanding and modeling water stress effects on plant growth processes. *Advances in Agricultural Systems Modeling Series 1*. Chapter 11.

Primack R.B., Higuchi H. & Miller-Rushing A. J., 2009. The impact of climate change on cherry trees and other species in Japan. *Biological Conservation* 142: 1943-1949.

Rasmont P., 1988. Monographie écologique et biogéographique des bourdons de France et de Belgique (Hymenoptera, Apidae, Bombinae). Ph.D. Thesis, Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat, Belgium.

Rasmont P., Coppee A., Michez D. & De Meulemeester, 2008. An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 44 (1) : 243-250.

Rasmont P., Pauly A., Terzo M., Patiny S., Denis Michez, Iserbyt S., Barbier Y. & Haubruge E., 2005. The survey of wild bees (Hymenoptera, Apoidea) in Belgium and France. FAO-report 2005.

Rasmont P. & Iserbyt S., 2012. The Bumblebees Scarcity Syndrome: Are heat waves leading to local extinctions of bumblebees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*)? *Annales de la Société Entomologique de France* 48 (3–4) : 275-280.

Richardson A., Keenan T. F., Migliavacca M., Ryu Y., Sonnentag O. & Toomey M., 2013. Climate change, phenology, and phonological control of vegetation feedbacks to climate system. *Agricultural and Forest Meteorology* 169 : 156-173

Ricketts T.H., Regetz J., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremen C., Bogdanski A., Gemmmil-Herren B., Greenleaf S.S., Klein A.M., Mayfield M.M., Morandin L.A., Ochieng A. & Viana B.F., 2008. Landscape effects on crop pollination services: are there general patterns? *Ecology Letters* 11: 499–515.

Sato S., Peet M.M. & Thomas J.F., 2002. Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. Exposed to moderately elevated temperatures. *Journal of Experimental Botany* 53 (371) : 1187-1195.

Selak G.V., Perica S., Ban S.G. & Poljak M., 2013. The effect of temperature and genotype on pollen performance in olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae* 156: 38–46.

Sgolastra F., Kemp W.P., Buckner J.S., Pitts-Singer T.L., Maini S. & Bosch J., 2011. The long summer: Pre-wintering temperatures affect metabolic expenditure and winter survival in a solitary bee. *Journal of Insect Physiology* 57 (12), 1651–1659

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

Stone G.N., 2008. Activity patterns of females of the solitary bee *Anthophora plumipes* in relation to temperature, nectar supplies and body size. doi: 10.1111/j.1365-2311.1994.tb00408.x

Tang R.-S., Zheng J.-C., Jin Z.-Q., Zhang D.-D., Huang Y.H. & Chen L.-G., 2008. Possible correlation between high temperature-induced floret sterility and endogenous levels of IAA, GAs and ABA in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regulation* 54 : 37–43.

Thomas C.D., Cameron A., Green R.E., Bakkenes M., Beaumont L.J., Collingham Y.C., Erasmus B.F.N., de Siqueira M.F., Grainger A., Hannah L., Hughes L., Huntley B., van Jaarsveld A.S., Midgley G.F., Miles L., Ortega-Huerta M.A., Townsend Peterson A., Phillips O.L. & Williams S.E., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427 : 145–148.

Vanderplanck M., Leroy B., Wathelet B., Wattiez R. & Michez D., 2013. Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, doi: 10.1007/s13592-013-0239-0.

Vanderplanck M., Moerman R., Rasmont P., Lognay G., Wathelet B., Wattiez R. & Michez D., 2014. How Does Pollen Chemistry Impact Development and Feeding Behaviour of Polylectic Bees? *PLoS ONE* 9(1): e86209. doi:10.1371/journal.pone.0086209

VijayaVenkataRaman S., Iniyar S., Goic R., 2012. A review of climate change, mitigation and adaptation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16:878– 897.

- Westhus C., Kleineidam C.J., Roces F. & Weidenmuller, 2013.** Behavioural plasticity in the fanning response of bumblebee workers: impact of experience and rate of temperature change. *Animal Behaviour* 85: 27-34.
- Williams P.H. & Osborne J.L., 2009.** Bumblebee vulnerability and conservation world-wide. *Apidologie* 40: 367–387.
- Williams P.H., Araujo M.B. & Rasmont P., 2007.** Can vulnerability among British bumblebee species be explained by niche position and breadth? *Biological Conservation* 138: 493 –505.
- Williams, P.H., 1986.** Environmental change and the distributions of British bumble bees (*Bombus* Latr.). *Bee World* 67: 50–61.
- Williams P.H., 1988.** Habitat use by bumble bees (*Bombus* spp.). *Ecological Entomology* 13: 223–237.
- Williams, P.H., 1989.** Bumble bees – and their decline in Britain. Central Association of Bee-Keepers, Ilford. See www.nhm.ac.uk/research-curation/projects/bombus/decline.html.
- Willmer P., 2012.** Ecology: Pollinator–Plant Synchrony Tested by Climate Change. *Current Biology* 22 (4). <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2012.01.009>
- Winfree, R. & Kremen C., 2009.** Are ecosystem services stabilized by differences among species? A test using crop pollination. *Proceedings of the Royal Society Biological sciences* 276: 229–237.
- Yuan J. S., Himanen S. J., Holopainen J. K., Cheng F. & Stewart Jr C.N., 2009.** Smelling global climate change: mitigation of function for plant volatile organic compounds. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (6) : 323-331.