

Université de Mons
Faculté des sciences
Laboratoire de zoologie

**L'aubépine, une pharmacie naturelle ? Etude de la toxicité et du
potentiel médicatif de *Crataegus monogyna* (Jacq.) sur l'abeille
sauvage sociale *Bombus terrestris* (L.).**

Directeurs de mémoire :

Pr. Denis Michez,

Dr. Maryse Vanderplanck

Mémoire de fin d'études présenté par

Martin Bégou

En vue de l'obtention du grade de

Maître en Sciences Biologiques

Année académique 2020 - 2021

M. Bégou, 2021. L'aubépine, une pharmacie naturelle ? Etude de la toxicité et du potentiel médicatif de *Crataegus monogyna* (Jacq.) sur l'abeille sauvage sociale *Bombus terrestris* (L.). Mémoire de Master en Biologie des Organismes et Ecologie, Université de Mons, 82p.

Résumé : Les interactions entre plantes et pollinisateurs sont le fruit de millions d'années d'évolution, et sont régies par des phénomènes aussi divers que complexes. Une part importante de celles-ci sont médiées par les métabolites spécialisés contenus dans les différents organes de ces plantes et consommés par les pollinisateurs. Ces composés, représentés par une grande diversité, ont de multiples propriétés. En effet, les humains, par exemple, utilisent depuis des siècles les plantes pour leurs vertus médicinales. Néanmoins, les connaissances concernant ces interactions et les métabolites impliqués demeurent extrêmement fragmentaires, et les recherches se sont en général portées sur les parties végétatives des plantes.

Ce travail se concentre sur l'étude de l'aubépine à un style, *Crataegus monogyna*, et plus particulièrement sur les flavonoïdes contenus dans le pollen de celle-ci. En premier lieu, la composition chimique de ce pollen a été caractérisée et comparée à d'autres parties de la plante, permettant ainsi de mettre en lumière les éventuelles particularités chimiques de celui-ci. Ensuite, la toxicité ainsi que les éventuelles propriétés thérapeutiques de ces composés ont été évaluées dans le cadre de bio-essais sur l'abeille sauvage *Bombus terrestris*, notamment dans des conditions non-saines induites par la présence de l'endoparasite *Crithidia bombi*.

Les résultats ont permis de confirmer le postulat selon lequel le modèle *C. monogyna* constitue une espèce abritant une diversité chimique importante, tant dans sa globalité qu'en comparant les parties étudiées. L'impact négatif de l'endoparasite *C. bombi* sur *B. terrestris*, largement traité dans la littérature scientifique, est également appuyé par les observations. Le bourdon terrestre semble, indépendamment de toute autre variable, peu adapté au pollen d'aubépine. Cependant, l'hétérogénéité importante des résultats ne permettent pas de tirer de conclusions sur la toxicité unique des flavonoïdes du pollen de *C. monogyna*, ni sur un potentiel effet médicatif de ceux-ci sur le pollinisateur impliqué dans ce travail.

Mots-clefs : *Crataegus monogyna*, *Bombus terrestris*, *Crithidia bombi*, pollen, flavonoïdes, métabolites spécialisés.

Remerciements

Car ce travail n'aurait été possible sans leur soutien, je tiens par ces quelques mots à remercier toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Tout d'abord, je remercie le Professeur Denis MICHEZ ainsi que le Docteur Maryse VANDERPLANCK, qui m'ont accordé leur confiance et permis de réaliser ce mémoire particulièrement enrichissant. Leur expérience, leurs compétences scientifiques et leurs précieux conseils ont été indispensables dans cette fin de parcours.

J'adresse une pensée particulière au Docteur Maryse VANDERPLANCK qui, tout au long de cette année, a été un véritable pilier rendant ces travaux possibles. Son professionnalisme, sa disponibilité ainsi que sa bonne humeur sont tant de qualités qui ont joué un rôle prépondérant dans la réalisation de ce mémoire.

Ensuite, je tiens à remercier mon camarade Antoine GEKIERE, qui fut un collègue des plus sérieux, enthousiastes et agréables. Sa passion pour les sciences ainsi que son expertise naissante ont été un point clef dans l'achèvement d'un tel travail.

Je remercie Irène SEMAY, doctorante au Laboratoire S2MOS de l'Université de Mons, qui a été indispensable dans la réalisation d'une partie considérable de ce projet. Son investissement et son expertise ont été primordiaux dans la réalisation des manipulations.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres du Laboratoire de Zoologie de l'Université de Mons. Leurs conseils avisés, leur expertise dans de nombreux domaines, leur soutien durant les expérimentations ou simplement leur sympathie ont permis un travail efficace et agréable.

Bien sûr, j'ai une pensée émue pour l'ensemble de mes amis, qui ont contribué à rendre ces six années d'études et ces vingt-trois premières années tout bonnement inoubliables. Certaines rencontres ont le don de forger une personne, certains liens apparaissent rapidement comme évidents, impérissables. Avec la fin de ces études, une page se tourne, certes, mais la simple idée que cette histoire ne fait que commencer me remplit de joie. Merci pour tout.

Enfin, rien de tout cela ne serait possible sans les membres de ma famille. Vous avez fait de moi la personne que je suis et avez toujours su tirer le meilleur de moi-même tout au long de mon parcours. Aucun mot ne saurait décrire la gratitude et l'amour que j'ai pour vous.
Merci.

Table des matières

1.	Contexte de l'étude	7
1.1	Déclin des abeilles	7
1.2	Projet ARC – Métaflore.....	8
2.	Introduction.....	10
2.1	Plantes angiospermes.....	10
2.1.1	Généralités	10
2.1.2	Apparition et histoire évolutive.....	11
2.1.3	Pollinisation	12
2.2	Pollinisateurs – abeilles	13
2.2.1	Apparition et histoire évolutive.....	13
2.2.2	Diversité.....	13
2.2.3	Mode de vie.....	16
2.2.4	Intérêts écologiques et économiques	16
2.2.5	Bourdon	16
2.3	Interactions entre plantes et abeilles.....	19
2.3.1	Généralités	19
2.3.2	Récompenses florales : caractéristiques chimiques.....	22
2.4	Métabolites spécialisés dans le pollen	24
2.5	Pathogènes de bourdon.....	27
3.	Objectifs.....	28
4.	Matériel et méthode	29
4.1	Modèles biologiques	29
4.1.1	Pollinisateur : <i>Bombus terrestris</i>	29
4.1.2	Modèle d'angiosperme : <i>Crataegus monogyna</i>	30
4.1.3	Modèle de parasite : <i>Crithidia bombi</i>	32
4.2	Caractérisation des flavonoïdes de l'aubépine	34
4.2.1	Collecte des échantillons.....	34
4.2.2	Analyses chimiques	34
4.3	Essais biologiques	36
4.3.1	Plan expérimental.....	36
4.3.2	Diètes polliniques	37
4.3.3	Traitements impliquant les parasites.....	39
4.4	Paramètres mesurés.....	42
4.4.1	Développement et collecte de ressources des micro-colonies.....	42
4.4.2	Suivi de la charge parasitaire.....	43

4.4.3	Mesures du corps gras.....	43
4.5	Analyses statistiques	44
4.5.1	Flavonoïdes de l'aubépine.....	44
4.5.2	Données issues des essais biologiques.....	45
5.	Résultats.....	46
5.1	Analyses chimiques	46
5.1.1	Analyses fines	46
5.1.2	Concentrations totales en flavonoïdes des différentes parties	47
5.1.3	Proportions des composés	48
5.2	Collecte des ressources	49
5.3	Développement des micro-colonies.....	54
5.3.1	Développement du couvain	54
5.3.2	Mortalités	59
5.3.3	Efficacité pollinique	62
5.3.4	Dilution du pollen	63
5.4	Corps gras	64
5.5	Charge parasitaire	66
6.	Discussion.....	67
6.1	Analyses chimiques	67
6.2	Toxicité des composés.....	68
6.3	Impact sur <i>C. bombi</i>	69
6.4	Limitations	69
7.	Conclusion	71
8.	Perspectives.....	71
9.	Références.....	72

1. Contexte de l'étude

1.1 Déclin des abeilles

Il est aujourd'hui établi que la biodiversité est, de manière générale, en déclin. Malheureusement, les apoïdes n'y échappent pas, comme ont pu le constater de nombreuses études, tant à l'échelle nationale (Leclercq et al., 1980 ; Rasmont et al., 2005 ; Biesmejer et al., 2006 ; Patiny et al., 2009) que continentale (Xie et al., 2008 ; Inoue et al., 2008 ; Grixti et al., 2009 ; Cameron et al., 2011), ce qui traduit un aspect global du problème. Malgré leurs intérêts écologiques et économiques majeurs (Constanza et al., 1997 ; Klein et al., 2007), l'état des populations d'abeilles est globalement alarmant et pourrait s'avérer de plus en plus problématique dans un monde toujours plus artificialisé (Tilman et al., 2001).

Une combinaison de facteurs est à l'origine de ce déclin mondial, intervenant directement ou indirectement sur les populations d'apoïdes.

Tout d'abord, le dérèglement climatique participerait à modifier les aires de distribution (bien que cela semble davantage provoqué par l'artificialisation ; Duchenne et al., 2020) et les effectifs des populations (Thomas et al., 2006), les affectant directement ou indirectement via leurs plantes hôtes ou leurs sites de nidification. Les situations climatiques extrêmes pourraient également porter préjudice aux espèces vulnérables (Williams et al., 2007). Par exemple, le réchauffement climatique semble de manière générale porter préjudice aux bourdons (Kerr et al., 2015). Il est cependant compliqué de tirer des conclusions concernant l'unique réchauffement climatique en raison de ses multiples effets, de ses interactions avec d'autres menaces et de l'interdépendance des espèces constituant les écosystèmes. En effet, il semble que l'impact de celui-ci puisse s'avérer positif comme négatif en fonction des régions, des espèces (selon leur histoire évolutive) et saisonnalités concernées (Duchenne, 2020).

D'une façon probablement plus importante, les modifications des techniques agricoles ont eu un énorme impact sur la biodiversité des pollinisateurs. L'exploitation de monocultures majoritairement anémophiles sur des surfaces toujours plus étendues associée à l'urbanisation ont provoqué une drastique réduction des habitats, considérée aujourd'hui comme la principale menace pour les espèces indigènes (Kremen et al., 2007 ; Goulson, 2006

; Goulson et al., 2008). L'utilisation intensive de pesticides en agriculture intensive réduirait aussi significativement les populations (Blacquiere et al., 2012).

La mondialisation apporterait également son lot de conséquences. Par exemple, l'introduction d'espèces exotiques envahissantes participerait à réduire la biodiversité (Sala et al., 2000) en perturbant les écosystèmes dans leur ensemble (Traveset & Richardson, 2006 ; Saad et al., 2009). La commercialisation mondiale d'abeilles, quant à elle, faciliterait la propagation de divers pathogènes, induisant une nuisance notable des espèces locales (Goulson et al., 2008 ; Stout & Morales, 2009 ; Arbetman et al., 2013).

L'ensemble de ces facteurs a un impact considérable sur les écosystèmes. L'uniformisation et la fragmentation des habitats, les changements climatiques, la mondialisation et l'agriculture intensive sont autant de facteurs menant à la diminution de la biodiversité des apoïdes directement, ou des plantes à fleurs qui sont l'unique ressource alimentaire de ceux-ci. La totale dépendance de la majorité des habitats ainsi que de l'industrie agro-alimentaire envers les pollinisateurs et les plantes à fleurs en fait une question centrale pour l'avenir.

Dans ce contexte, il est important de diversifier les recherches en explorant de nouvelles pistes, innovantes et prometteuses, afin de répondre à de telles problématiques. Ce mémoire s'inscrit dans un tel projet.

1.2 Projet ARC – Métaflore

Depuis toujours, les animaux ainsi que l'Homme utilisent les plantes et les molécules bioactives qu'elles contiennent pour faire face à différentes maladies, notamment parasitaires. Alors que les parties végétatives de la plante, accessibles une grande partie de l'année, sont aujourd'hui couramment utilisées à des fins pharmaceutiques et sont donc grandement connues, l'utilisation des parties germinatives (fleurs, fruits) reste très peu répandue. Pourtant, certaines études démontrent la présence de molécules bioactives dans le pollen et le nectar des angiospermes, largement consommés par les abeilles. Ces métabolites auraient dans certains cas des propriétés antimicrobiennes (Compean & Ynalvez 2014), menant potentiellement à une amélioration de l'état de santé des pollinisateurs (Manson et al. 2010 ; Vaudo et al. 2015).

Le projet ARC – Métaflore s'inscrit dans une optique de conservation de la nature et a été mis en place par trois services de l'Université de Mons. Celui-ci, supervisé par une équipe pluridisciplinaire de pharmaciens (Dr. Pierre Duez, Dr. Amandine Nachtergaele), d'entomologistes (Dr. Denis Michez, Dr. Maryse Vanderplanck) et de chimistes (Dr. Pascal Gerbaux, Irène Semay), a pour but de remplir trois objectifs :

- (i) Identifier et caractériser plusieurs groupes de biomolécules actives présentes dans une sélection de plantes réputées médicinales et mellifères, recensées en Europe occidentale ;
- (ii) Définir des effets sur la modulation de biofilm bactérien par le biais de bio-essais sur culture bactérienne ;
- (iii) Définir des effets thérapeutiques et/ou toxiques de ces composés chez les abeilles sauvages par le biais de bio-essais au cours d'élevages contrôlés.

Sur base des résultats obtenus sera proposée une liste de plantes jugées bénéfiques pour l'état sanitaire des abeilles et susceptible d'être favorisé dans les bande fleuries. De plus, les résultats seront une base pour la recherche de propriétés médicinales appliquées à l'Homme de parties de plantes méconnues d'espèces indigènes.

Ce mémoire se concentre sur les volets (i) et (iii). Il ne traitera pas de bio-essais sur culture bactérienne.

2. Introduction

2.1 Plantes angiospermes

2.1.1 Généralités

Les angiospermes (Plantae ; Tracheophyta ; Spermatophytina), aussi nommés plantes à fleurs, sont un groupe monophylétique caractérisé par une anatomie unique au sein des plantes. Au niveau des organes reproducteurs (hormis la présence évidente de fleurs), des ovules abrités par des carpelles, la double fertilisation résultant en un endosperme triploïde ainsi que des gamétophytes mâle et femelle fortement réduits en sont les principales caractéristiques (Friis et al., 1987). Les plantes à fleurs présentent également un système vasculaire particulier, plus complexe que chez les autres spermatophytes, ainsi que la présence de feuilles habituellement larges et de formes foliaires diverses (Friis et al., 1987). Néanmoins, il est compliqué d'attribuer des caractéristiques exclusives aux angiospermes étant donné leur diversité morphologique et le fait qu'on retrouve certains caractères de manière sporadique chez les gymnospermes (Friis et al., 1987).

Ses 240 000 à 300 000 espèces selon les estimations font de ce clade le plus diversifié parmi les plantes (Sporne, 1974 ; Prance, 1977). A l'exception de la toundra et de la taïga, les angiospermes dominent l'ensemble des biomes terrestres, dont ils représentent la majorité de la production primaire (Friis et al., 1987). Leur diversité s'exprime tant en terme d'habitats que de morphologies. En effet, des plantes aquatiques flottantes aux phanérophytes en passant par les herbacées ou encore les épiphytes, ces organismes sont omniprésents dans toutes les strates végétales (Fig. 1). Bien que la majorité soit autotrophe, certains sont parasites ou encore saprophytes



Figure 1 : les angiospermes varient grandement en fonction des familles, genres et espèces, comme illustré ici avec, de gauche à droite : (1) *Nymphaea alba*, (2) *Quercus ilex*, (3) *Ophrys tenthredinifera*, (4) *Rafflesia arnoldii* (Google Images, images libres de droits).

2.1.2 Apparition et histoire évolutive

Les plantes à fleurs sont vraisemblablement apparues durant le Jurassique (entre 208 et 145 millions d'années avant notre ère), mais devront attendre la fin de la période du Crétacé pour dominer la flore terrestre (De Bodt et al., 2005 ; Friis et al., 1987). Cette explosion a initié de grands changements au sein des écosystèmes qui ont permis la diversification de ce clade (Friis et al., 1987).

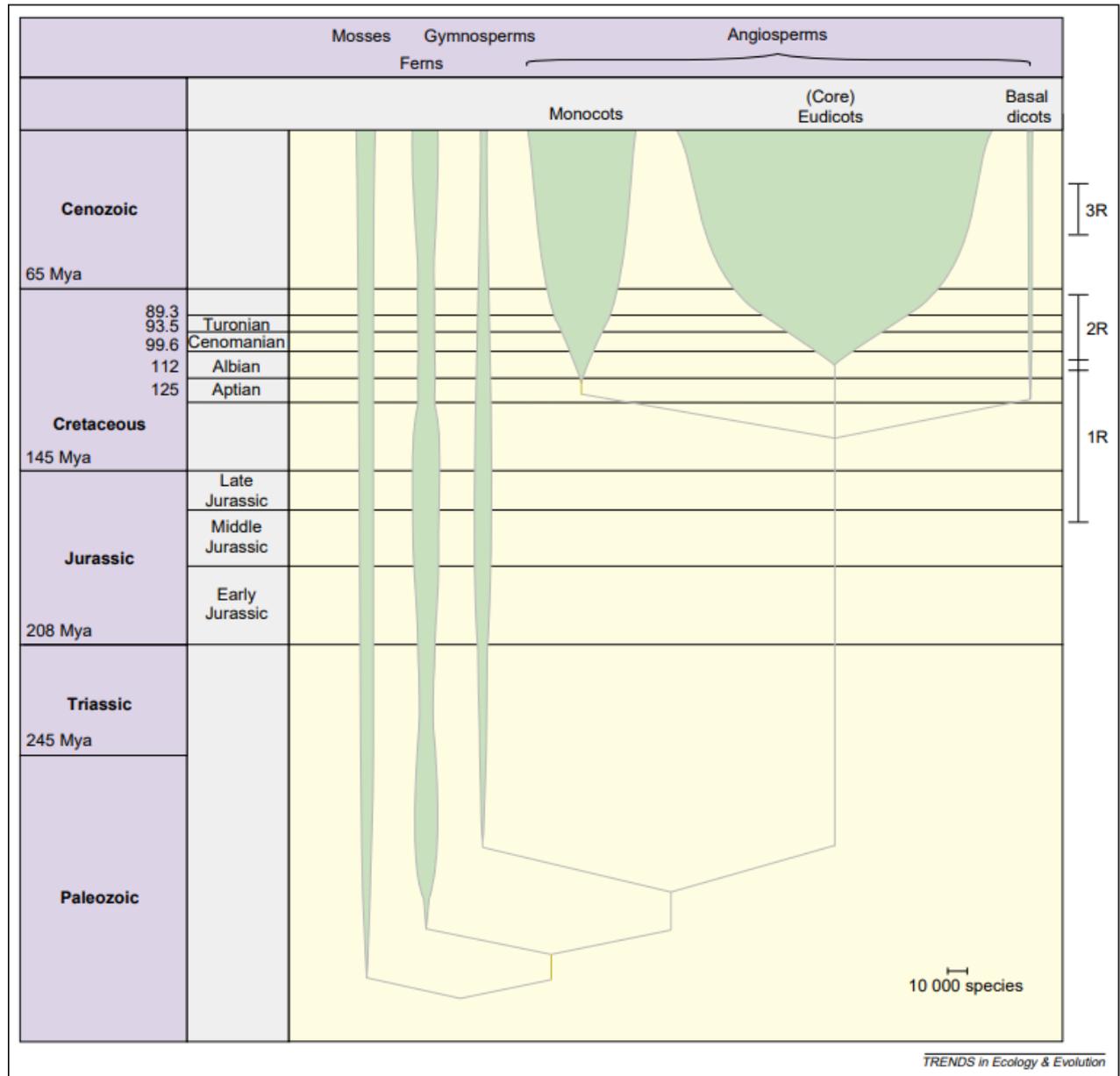


Figure 2 : Echelle stratigraphique et position phylogénétique généralisée des plantes terrestres (d'après De Bodt et al., 2005)

2.1.3 Pollinisation

La pollinisation, qui consiste en la réunion des deux gamétophytes, provoque la fécondation et ainsi la fusion des gamètes. À la suite de cela, le tégument de l'ovule durcira et se déshydratera, formant ainsi la graine (Drews et al., 2002). L'ovaire, quant à lui, formera un fruit par durcissement ou accumulation de réserves. Ce fruit, apparu chez les angiospermes, permettra une dissémination plus efficace des graines. Cette dissémination sera effectuée par des vecteurs biotiques (les animaux) ou abiotiques (le vent, l'eau).

La pollinisation peut être décrite en trois étapes distinctes : (1) la libération du pollen par l'anthere, (2) le transfert du pollen vers l'organe femelle et (3) la fixation du pollen sur le pistil suivi de la germination du grain de pollen, assurant le transport de la cellule germinative mâle vers l'ovule (Faegri & Van der Pijl, 1979).

La pollinisation peut être décrite en fonction du type de fécondation. D'une part, les cellules germinatives mâle et femelle peuvent trouver leur origine sur un même individu, voire sur une même fleur : on parle d'autopollinisation, pouvant mener à l'autogamie. Selon la plante autogame choisie, différents mécanismes peuvent être observés. Par exemple, certaines assurent une pollinisation cléistogame : dans ce cas, la pollinisation s'effectue dans une même fleur avant même l'ouverture de cette dernière. Ce mécanisme permet une économie de ressources considérable étant donné l'efficacité évidente de celui-ci (Lloyd & Schoen, 1992). C'est notamment le cas de nombreuses graminées (Lord, 1981). Un autre mécanisme est la géitonogamie : dans ce cas, la pollinisation se fait sur des fleurs distinctes d'un même individu. Ce phénomène est particulier car il implique les mécanismes écologiques de la pollinisation croisée tout en conservant les attributs génétiques de l'autopollinisation (Faegri & Van der Pijl, 1979 ; Lloyd & Schoen, 1992). C'est notamment le cas de *Ipomopsis aggregata* (de Jong et al., 1991).

D'autre part, la fécondation peut être croisée. Autrement dit, le matériel génétique provient d'individus distincts. Ce phénomène est appelé allopollinisation, rencontrée chez les plantes allogames. Il est établi que cette forme de fécondation possède un avantage sélectif considérable, permis par le brassage génétique de la fécondation croisée (Faegri & Van der Pijl, 1979).

Les différents taxa d'angiospermes assurent la pollinisation par divers vecteurs, classés en deux catégories : les pollinisations abiotique et biotique. La pollinisation abiotique repose sur des phénomènes purement physiques et donc non-directionnels. La chance a donc souvent une incidence importante, entraînant une efficacité moindre ainsi qu'un rendement très bas (Faegri & Van der Pijl, 1979). Il existe deux types de pollinisation abiotiques : la pollinisation anémophile et la pollinisation hydrophile, respectivement médiée par le vent et par l'eau. Quant à la pollinisation biotique, elle est assurée par des animaux. Ce phénomène engendre en général une forme de relation entre plante et vecteur, régissant en partie l'évolution des deux parties. A l'opposée de la pollinisation abiotique, la pollinisation biotique est directionnelle, ciblée. Elle est donc naturellement plus efficace et a été améliorée au cours du temps du fait de coévolutions des plantes à fleurs et de leurs pollinisateurs associés.

Ce type de pollinisation implique une grande diversité de taxa, tels que les chiroptères ou certains oiseaux. Elle est néanmoins majoritairement représentée par les insectes, plus particulièrement par les hyménoptères apoïdes.

2.2 Pollinisateurs – abeilles

2.2.1 Apparition et histoire évolutive

Le milieu du Crétacé vit apparaître le groupe monophylétique Anthophila, largement représenté par les abeilles modernes, qui dérive de guêpes prédatrices apoïdes (Michez et al., 2012). Leur émergence ainsi que leur vaste diversité observable de nos jours est étroitement liée aux angiospermes, qui connurent à cette époque une explosion similaire pour former les quelques 250 000 espèces connues aujourd'hui (Grimaldi, 1999 ; Soltis and Soltis, 2004).

2.2.2 Diversité

Le clade des Anthophila représente aujourd'hui plus de 20 000 espèces connues, dont plus de 2 000 présentes en Europe (Nieto et al., 2014). Celui-ci fait partie intégrante des Hyménoptères, et plus précisément des Aculeata. Ces derniers sont caractérisés par un dard dérivé de l'ovipositeur présent chez les femelles, et incluent les fourmis, les guêpes et les

abeilles (Michener, 2000). Bien que l'écrasante majorité des abeilles se différencient des autres Aculéates par une pilosité importante, certaines ont un aspect glabre similaire aux guêpes. La différence principale se trouve davantage dans leur régime alimentaire. En effet, les abeilles nourrissent généralement leurs larves de pollen, source importante de protéine et collecté sur les fleurs d'angiospermes, par opposition aux guêpes qui, elles, sont carnivores à l'état larvaire (Michener, 2000).

Morphologiquement, les Apoidea (Sphecoides et Anthophila) sont reconnaissables par deux caractéristiques majeures : (1) le lobe pronotal postérieur est distinct bien que petit, et séparé des tegulae ; et (2) le pronotum s'étend ventralement de chaque côté et encercle au moins en partie les coxae antérieurs (Michener, 2000). Les abeilles (Anthophila), quant à elles, se différencient des Sphecoides par trois caractères majeurs : (1) des poils branchus, souvent plumeux, (2) des basitarses postérieurs plus développés que les autres segments tarsaux et (3) le proboscis est en général plus développé que chez les Sphecoides (Michener, 2000).

L'avènement parallèle des angiospermes et de ce clade d'hyménoptères a permis une grande diversité en terme de morphologies (Fig. 4). En effet, parmi les nombreuses familles qui composent les apiformes (Anthophila), des différences notables sont observées, parfois même jusqu'à l'espèce, permettant habituellement une identification phénotypique robuste (Fig. 3).

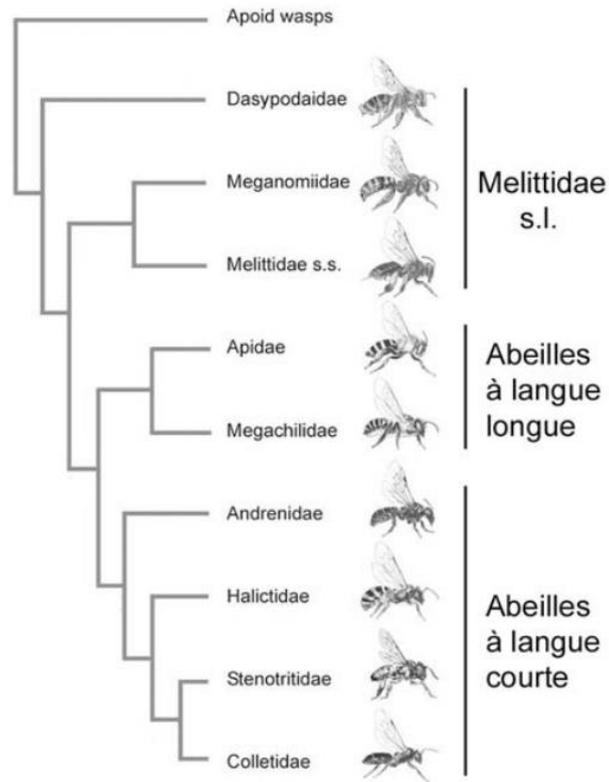


Figure 3 : Cladogramme des Apoidea apiformes basé sur la morphologie des adultes et sur le séquençage de 5 gènes (d'après Danforth et al., 2006 et Michez, 2007).



Figure 4 : Images illustrant la diversité morphologique des Anthophila en fonction des familles, tribus, genres et espèces. De gauche à droite et de haut en bas, *Bombus lapidarius*, *Andrena gravaida*, *Eucera longicornis*, *Lasioglossum xanthopus* (Google Images, images libres de droits).

2.2.3 Mode de vie

Les abeilles présentent des niveaux de sociabilité divers et variés en fonction des taxa observés. Certaines sont entièrement solitaires, telles que les Andrenidae et les Melittidae. A contrario, certaines familles ont développé une sociabilité plus ou moins complexe, mise en lumière par une collaboration étroite et l'usage d'un nid commun (Pouvreau, 2004). C'est notamment le cas de nombreuses Apidae.

Les abeilles, quelles qu'elles soient, ont des habitudes alimentaires établies qui reposent sur deux phénomènes : la constance individuelle et la spécialisation de la plante hôte (Cane & Sipes, 2006). Ces habitudes sont généralement associées au niveau de sociabilité des espèces. En effet, les espèces hautement sociales seront davantage polylectiques (visitent un large éventail d'espèces florales diversifiées phylogénétiquement), tandis que les espèces solitaires auront une plus grande tendance à l'oligolectisme (visitent de peu d'espèces florales, proches phylogénétiquement).

2.2.4 Intérêts écologiques et économiques

Il est aujourd'hui évident que les abeilles représentent une nécessité pour l'écrasante majorité des biomes terrestres du fait de leur activité de pollinisateur. Outre leur intérêt évident pour l'homme dans la production de miel ou la pollinisation de bon nombre de cultivars tels que les Solanacées (tomates, aubergines, melons,...) et autres fruits massivement consommés, elles participent à la pollinisation de 80% de l'ensemble des angiospermes, qui sont souvent à la base de la chaîne alimentaire de la vie sauvage (Buchmann & Nabhan, 1996 ; Nayak et al, 2020). Elles sont aussi un point clef dans la fécondation croisée des plantes capables d'autofécondation, chez qui la fécondation croisée présente des avantages évolutifs évidents (Michener, 2000).

2.2.5 Bourdons

Les bourdons (Hymenoptera : Apoidea : genre *Bombus*) sont des pollinisateurs représentés par plus de 250 espèces autour du globe (Williams et al., 2008), dont 69 en Europe (Rasmont et al., 2015). Ils ont en général un aspect plus large que leur homologues apoïdes, sont

densément velus et capables d'endothermie. Pour ces raisons, ils ont largement colonisé les milieux tempérés, alpins et arctiques (Goulson, 2003).

Les bourdons ont un cycle de vie dit annuel. Les reines sortent d'hibernation à la fin de l'hiver ou au printemps et se mettent en quête d'un abri approprié pour nidifier. La reine, à l'aide de pollen collecté, forme donc un nid dans lequel elle pondra et couvrira ses premiers œufs. La reine se chargera de l'ensemble des tâches de la colonie, de la collecte d'aliments au nourrissage en passant par la formation du couvain jusqu'aux premières émergences qui auront lieu 4 à 5 semaines après la ponte (Goulson, 2010). Ensuite, les individus fraîchement émergés (presque uniquement des femelles) se chargeront de la collecte et participeront activement aux tâches du couvain (Goulson, 2010).

Si la colonie parvient à atteindre une certaine taille (entre avril et août selon les conditions), celle-ci débute la production de mâles et de reines, autrement dit d'individus reproducteurs. Il est établi que le climat joue un rôle prépondérant dans l'avènement de ce phénomène, mais il semble également que le nombre d'individus au sein de la colonie soit important étant donné l'attention dont les futures reines ont besoin (Goulson, 2010).

Chez les hyménoptères, les mâles sont haploïdes tandis que les femelles sont diploïdes. Autrement dit, les œufs non fertilisés donneront naissance à des mâles et inversement. La reine peut donc contrôler le sexe de sa progéniture. Bien que les ouvrières soient également en mesure de pondre, elles ne s'accouplent pas. Elles ne produisent donc que des œufs haploïdes qui donneront naissance à des mâles. Ce cas est notamment observé quand des ouvrières sont privées de leur reine. Dans ce cas, elles formeront tout de même un couvain composé d'œufs haploïdes.

Après émergence, les jeunes reines partent en recherche de nourriture mais demeurent inféodées à la colonie. Elles ne participeront pas aux tâches mais se concentreront sur leur nourrissage et la formation d'importantes réserves en prévision de l'hibernation. Quant aux mâles, ils quittent définitivement la colonie afin de se mettre en recherche d'un partenaire sexuel. Chaque mâle marquera quelques sites de phéromones sexuelles destinées à attirer les reines. Ils visiteront ensuite ces sites régulièrement dans l'espoir de trouver une partenaire sexuelle.

Après accouplement, les reines débutent la recherche d'un site d'hibernation. Une fois l'emplacement trouvé, elles creuseront une chambre ovale dans laquelle elles passeront toute la période de dormance jusqu'au printemps prochain. La colonie mère, à la suite du départ des reines ainsi que des mâles, va rapidement périr jusqu'à la mort de chaque individu. Il n'en restera rien l'année suivante.

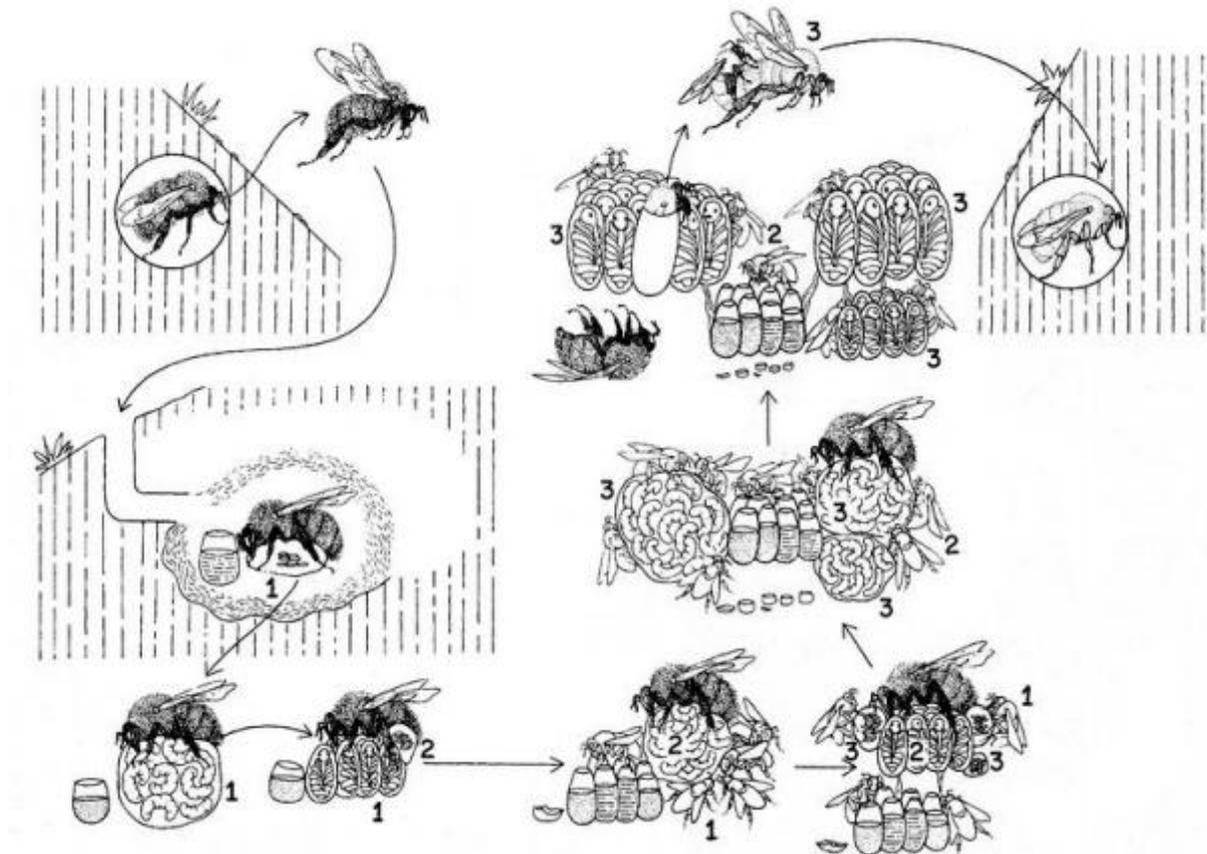


Figure 5 : diagramme du cycle d'une colonie de bourdons. Sur celui-ci sont représentés (1) la fondation de la colonie par la reine, (2) le développement des larves et (3) l'apparition, l'émergence et l'accouplement d'individus reproducteurs (d'après Heinrich, 1979).

Les bourdons, grâce à leur morphologie et comportement particuliers, remplissent un rôle complémentaire aux autres pollinisateurs. Ils sont plus efficaces que les abeilles mellifères à basses températures et luminosités (Goulson, 2010) et sont donc plus adaptés à la pollinisation d'espèces florales tempérées, alpines et arctiques. Plus robuste que les autres abeilles, ils demeurent actifs par mauvais temps. Ils tendent à visiter davantage de fleurs pour un individu donné, améliorant ainsi la pollinisation et sont également capables de soniquer les anthères, comportement indispensable pour la pollinisation des familles de plantes à anthères poricides telles que les Solanacées (Nayak et al. 2020). De plus, leur

longue langue leur permet de visiter les espèces à corolle longue. Ils jouent globalement un rôle clef dans la pollinisation des fleurs sauvages mais sont également très importants pour la pollinisation des cultures. Selon Free & Butler (1959), ils assurent une pollinisation plus efficace que les abeilles mellifères pour une large gamme de fruits comestibles tels que la tomate, la pastèque, le poivron, la fraise ou encore la canneberge. Ils sont aussi parfaits pour une utilisation en serre, où leur usage se démocratise grandement.

2.3 Interactions entre plantes et abeilles

2.3.1 Généralités

La grande diversité en espèces, tant en angiospermes qu'en abeilles, s'explique en partie par les interactions entre ces deux groupes, qui depuis le Crétacé influencent considérablement leur évolution. En effet, leurs relations mutualistes se sont complexifiées et spécialisées au cours du temps pour construire les interactions diverses et variées du monde moderne. Les abeilles, qui se nourrissent de pollen ainsi que de nectar tout au long de leur vie, sont totalement dépendantes de la plante. En échange, les abeilles assurent une pollinisation efficace de leurs plantes hôtes en visitant différentes fleurs d'une même espèce. Par le biais de ces phénomènes, les deux groupes ont développé des relations particulièrement intimes car étant partiellement voire totalement dépendants l'un de l'autre.

La récolte de pollen est une opération complexe, qui nécessite une grande habileté et qui fut forgée par des millions d'années de spécialisation. Pour ce faire, les abeilles ont adopté diverses stratégies de butinages. Ces stratégies sont classées en fonction du nombre d'espèces, de genres et de familles ou tribus différents butinés. Dans le cadre de ce travail, nous utiliserons la nomenclature de Cane & Sipes (2006) (Tab. 1).

Tableau 1 : Lexique de spécialisation de récolte de pollen des espèces d'abeilles en fonction du nombre de taxa butinés (d'après Cane & Sipes, 2006).

Classe de spécialisation	Nombres de taxa de plantes hôtes		
	Espèces	Genres	Tribus ou familles
Large polylectisme	Nombreuses	Nombreuses	>25% de familles disponibles
Polylectisme	Nombreuses	Nombreuses	4 à <25% de familles disponibles

Mesolectisme	Nombreuses	>4	1-3 familles ou grande tribus
Oligolectisme	>1	1-4	1
Oligolectisme éclectique	>1	2-4	2-3
Oligolectisme restreint	>1	1	1
Monolectisme	1	1	1

Si le polylectisme offre l'avantage considérable de réduire la dépendance des abeilles vis-à-vis d'une poignée de plantes hôtes (Eickwort & Ginsberg, 1980), l'oligolectisme a cependant été conservé au cours de l'évolution, avec une majorité des abeilles solitaires oligolectiques, et permet d'optimiser la récolte de pollen en ciblant au mieux un nombre limité d'espèces végétales (Strickler, 1979 ; Cane & Payne, 1988 ; Laverty & Plowright, 1988 ; Williams, 2003). Certaines pistes pourraient expliquer le succès de ce comportement de butinage, telles que la réduction de compétition interspécifique pour les ressources ou le fait que les espèces spécialistes collectent plus rapidement et plus efficacement le pollen que les espèces généralistes (Robertson, 1899, 1925 ; Linsley, 1958 ; Thorp, 1969 ; Michener 1979).

Le fait que ces pollinisateurs hautement spécialisés aient adopté des techniques efficaces, leur permettant de récolter la quasi-totalité du pollen d'une plante hôte peut être dommageable pour cette dernière (Müller et al., 2006 ; Westerkamp & Classen-Bockhoff, 2007). En effet, le pollen étant indispensable au cycle de vie de la plante, l'en priver revient à brider sa reproduction. Il est donc nécessaire de limiter l'exploitation de pollen tout en maintenant une attractivité telle que la pollinisation soit peu affectée (Praz et al., 2008 ; Sedivy et al., 2011). Les relations entre plantes et abeilles sont, de ce fait, différentes d'un simple mutualisme et sont qualifiées d'exploitation mutuelle en équilibre (Westerkamp, 1996).

Les espèces végétales ont développé de nombreuses techniques afin de répondre à ce problème. Ces techniques sont notamment morphologiques, avec par exemple :

(1) L'hétéranthérie

L'hétéranthérie est une adaptation morphologique permettant la spécialisation d'anthères différentes pour la pollinisation et le butinage, où celles destinées au pollinisateur seront

d'avantage visibles (Vogel, 1993). Ce trait permet de réduire la compétition entre plante hôte et pollinisateur.

(2) La dissimulation des anthères

Par différents mécanismes tels que des tubes floraux étroits chez les Boraginaceae et les Primulaceae, des fleurs nototribes dont les anthères sont placées sur les lèvres supérieures (Lamiaceae et Scrophulariaceae) ou les fleurs sténotribes dont les anthères sont placées sous des pétales modifiés formant une coque (Fabaceae), certaines fleurs rendent leur pollen inaccessible pour toute espèce non spécialisée. Par ce mécanisme, l'hôte s'assure donc d'être exploité par des visiteurs qui lui seront bénéfiques.

(3) La dissimulation du pollen

La dissimulation du pollen dans des anthères poricides rend inaccessible celui-ci aux espèces qui ne peuvent effectuer de sonication (Buchmann, 1983 ; Harder & Barclay, 1994).

(4) La libération progressive du pollen

Ce mécanisme oblige le pollinisateur à visiter la plante hôte de manière répétitive, améliorant l'efficacité de la pollinisation (Erbar & Leins, 1995 ; Schlindwein et al., 2005).

L'ensemble de ces morphologies particulières sont le fruit d'une pression sélective forte dans l'optimisation des ressources (Michez et al., 2012). Ces adaptations en font des fleurs difficilement exploitables qui sont uniquement butinées par des d'abeilles hautement spécialisées (Westerkamp, 1997).

Au-delà de ces caractères morphologiques, la sélection peut également agir sur la composition chimique du pollen afin de réguler la collecte de ce dernier (Praz et al., 2008). Bien que les mécanismes chimiques mis en place soient globalement peu connus, certaines études ont permis de mettre en lumière deux principaux moyens de régulation :

Premièrement, certaines familles d'angiospermes synthétisent des métabolites spécialisés particuliers ayant une activité insecticide significative (par exemple la protoanémone chez les Ranunculaceae ; Praz et al., 2008). Le fait que les concentrations les plus hautes soient présentes dans les grains de pollen suggèrent que cette adaptation physiologique agisse activement dans la régulation de la récolte de pollen.

Deuxièmement, plusieurs études démontrent que les ressources florales de certaines plantes peuvent présenter des carences en nutriments (métabolites centraux), les rendant moins attractives. C'est le cas notamment de certaines Asteraceae qui présentent des carences en acides aminés essentiels dans leur pollen, tel que *Taraxacum officinale* (Praz et al., 2008 ; Roulston et al., 2000) ; mais aussi du pollen d'*Arbustus unedo* qui présente une carence en stérol essentiel pour le développement de l'abeille domestique, *Apis mellifera* (Rasmont et al., 2005)

L'ensemble de ces études suggère que ce n'est pas le pollinisateur qui choisit sa plante hôte, mais bien le contraire. En d'autres termes, les angiospermes régissent les interactions entre plantes et pollinisateurs par le biais des différents phénomènes abordés ci-dessus. Ainsi, elles façonnent véritablement les biotopes au sein desquelles elles sont incluses.

2.3.2 Récompenses florales : caractéristiques chimiques

Le pollen et le nectar, du fait de leurs rôles fondamentalement différents, possèdent des caractéristiques chimiques foncièrement différentes elles aussi. Leurs compositions ont donc été abordées séparément.

Le pollen

Le pollen est composé d'un large éventail de nutriments essentiels pour les pollinisateurs, expliquant en partie la grande diversité d'apoïdes herbivores (Strong et al., 1984). Celui-ci est bien sûr composé d'un bon nombre de métabolites centraux (glucides, protéines, acides nucléiques, lipides) mais également de métabolites spécialisés tels que des pigments et vitamines ainsi que de molécules simples tels que des sels minéraux et métaux (Pouvreau, 2004). Ces composés sont présents, selon les espèces, en concentrations très variables. Certains pollens seront donc naturellement plus nutritifs et donc privilégiés par certains pollinisateurs. Il est toutefois intéressant de souligner que certaines espèces apprécient davantage des pollens pauvres en acides aminés (Weiner et al., 2010).

Campos et al. (2008) suggèrent que les valeurs nutritives requises pour les abeilles sont les suivantes :

Tableau 2 : Suggestion des valeurs nutritives requises pour les abeilles (Campos et al., 2008).

Composé		Concentration
Eau	Pas plus de	6-8g/ 100g
Minéraux (total)	Pas plus de	6g/100g
Protéines (total)	Pas moins de	15g/100g
Sucres (total)	Pas moins de	40g/100g
Lipides	Pas moins de	1,5g/100g

La valeur nutritive du pollen est traditionnellement évaluée sur base de sa concentration en protéines. Cependant, il est de plus en plus établi que c'est davantage leur teneur en acides aminés (sous-unité des protéines) et en polypeptides (chaînes simples d'acides aminés) qui détermine les quantités de pollen nécessaires aux abeilles (Nicolson, 2011 ; Vanderplanck et al., 2014b). De plus, certains acides aminés sont considérés comme essentiels (tel qu'illustré dans le tableau 3 ; De Groot, 1953). En effet, une carence en ceux-ci peut mener à des défauts de croissance chez l'insecte (Chapman, 2012). Pour ces différentes raisons, la valeur nutritive du pollen pourrait être définie plus fidèlement par leurs teneurs en acides aminés et en polypeptides (Loper & Cohen, 1987 ; Vanderplanck et al., 2014).

Tableau 3 : Classification des acides aminés essentiels et non essentiels chez *Apis mellifera* (d'après de Groot, 1953).

Non essentiels	Peu essentiels	Moyennement essentiels	Essentiels
Tyrosine	Tryptophane	Arginine	Leucine
Cystéine	Méthionine	Lysine	Isoleucine
Sérine	Histidine	Phénylalanine	Valine
Hydroxyproline		Thréonine	
Alanine			
Glycine			
Proline			

Les stérols (groupes de stéroïdes appartenant aux lipides insaponifiables) sont un autre exemple de composés nutritifs essentiels au développement des abeilles et présents dans le pollen. En effet, ils sont impliqués dans la synthèse d'hormones ainsi que dans la formation

des membranes cellulaires. Il est donc primordial que les pollinisateurs puisent cette ressource dans leur alimentation (Clark & Bloch, 1959).

Le pollen contient également de nombreux métabolites spécialisés. Les plus présents, selon Palmer-Young et al. (2019), sont les flavonoïdes, les alcaloïdes, les terpènes ainsi que les composés phénoliques. Selon cette même étude, la richesse en métabolites spécialisés du pollen des 31 cultivars et plantes sauvages étudiés est en moyenne 63% plus élevée que dans le nectar. Ces résultats rejoignent la supposition selon laquelle ces métabolites jouent un rôle important dans la médiation de la récolte de pollen.

Le nectar

Le nectar est une substance relativement plus simple chimiquement. Il n'a en effet qu'un rôle pour la plante, contrairement au pollen : celui de médiateur des interactions entre plante hôte et visiteur en jouant le rôle de récompense dans le transport du pollen par l'animal qui s'en nourrit (Brandenburg et al., 2009 ; Heil, 2011).

Ce composé est produit au niveau des nectaires et est majoritairement composé d'eau et de sucres (hexoses tels que le glucose et le fructose, disaccharides tel que le sucrose), mais aussi de concentrations parfois significatives d'acides aminés qui peuvent impacter l'attractivité du nectar (Brandenburg et al., 2009 ; Heil, 2011).

De manière similaire au pollen, le nectar contient également divers métabolites spécialisés agissant notamment comme des agents anti-microbiens ou des répulsifs contre les animaux voleurs de nectar (Heil, 2011). C'est, à l'instar du pollen, une ressource essentielle dont l'utilisation se doit d'être optimisée.

2.4 Métabolites spécialisés dans le pollen

Les métabolites spécialisés (dit aussi métabolites secondaires), en opposition aux métabolites centraux (dit aussi métabolites primaires), sont des composés qui, contrairement à leur homologue, n'interviennent pas directement dans les phénomènes de croissance, de survie et de reproduction de la plante. Ils demeurent néanmoins essentiels car ils interviennent dans de nombreuses réactions métaboliques (vitamines, pigments, ...) et

interactions biotiques et abiotiques (mécanismes de défense chimique, communication, ...) des organismes avec leurs habitats.

Il existe une énorme diversité de métabolites spécialisés qui sont en grande majorité des molécules organiques. Dans le cadre de cette introduction seront succinctement présentées les grandes familles de métabolites spécialisés présents dans les plantes (et plus particulièrement dans le pollen de celles-ci) et susceptibles d'être intéressants dans ce cas précis. Cette liste non-exhaustive se base sur les résultats obtenus des analyses chimiques de 31 espèces végétales par Palmer-Young et al. (2018) et a pour but d'illustrer la diversité de ces molécules au sein des végétaux.

Alcaloïdes

Les alcaloïdes, majoritairement d'origine végétale, sont l'une des familles de métabolites les plus étudiés en raison de leurs multiples applications. Ils sont des molécules organiques à bases azotées, le plus souvent hétérocycliques. Ils présentent de nombreux effets tels que des activités antibactériennes (Cushnie et al., 2014) ou encore des actions dans le système nerveux central en tant que psychotropes et hallucinogènes (Simone et al., 2008). De part ces exemples, ils sont naturellement utilisés par les végétaux dans le cadre de mécanismes de défense et de compétition.

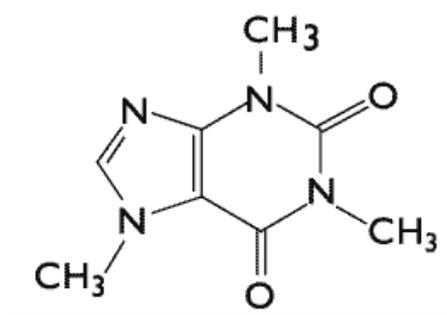


Figure 6 : structure de la molécule de caféine, alcaloïde présent notamment dans le café.

Terpènes

Les terpènes sont des molécules organiques généralement non cycliques possédant 5n atomes de carbones et considérés comme dérivés de l'isoprène (de las Heras et al., 2003) d'un point de vue structural. Bien qu'ils ne dérivent pas de l'isoprène au niveau métabolique, les terpènes sont des molécules dont les formules primaires sont des multiples de

l'isoprène : (C₅H₈)_n. Ils possèdent des vertus anti-inflammatoires (de las Heras et al., 2003) et antioxydantes (Grassman, 2005). Ils présenteraient également des effets géroprotecteurs (Proshkina et al., 2020) ou encore de catalyseurs de nitrification dans les sols (Bremmer et McCarty, 1988).

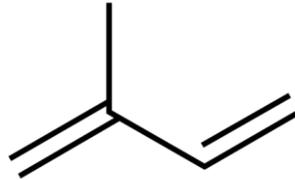


Figure 7 : structure de l'isoprène, sous-unité des terpènes.

Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une partie d'un large sous-groupe de métabolites spécialisés, les composés phénoliques. A ce jour, plus de 6500 d'entre eux ont été identifiés (Boumendjel et al., 2002). Ils sont très répandus chez les plantes et procaryotes (Middleton, 1998 ; Woo et al., 2002). Les flavonoïdes ont une structure de base correspondant au 2 – phénylchromane (C₆ -C₃ -C₆).

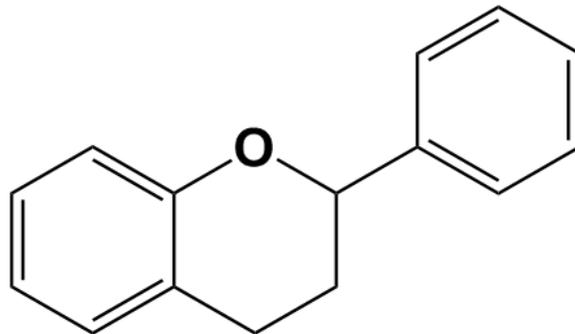


Figure 8 : structure du 2-phénylchromane, squelette de base des flavonoïdes.

Ils sont connus pour leurs fonctions biologiques diverses, telles que les réponses aux stress biotiques et abiotiques, ou encore la médiation des interactions écologiques (Pourcel et al., 2007).

Ils jouent un large éventail de rôles :

- Signaux (Peer et al., 2006)

- Phytoalexines, qui sont des molécules anti-pathogènes (Fawe et al., 1998 ; McNally et al., 2003).
- Agents antioxydants, limitant ainsi les méfaits des métaux lourds et des radicaux libres (Yamasaki et al., 1997 ; Jansen et al., 2001 ; Michalak, 2006)
- Stimulants de la germination des graines (Shirley, 1998 ; Gould & Lister, 2006).
- Filtres à UV (Lanot & Morris, 2005 ; Vergas & Lopez, 2003).
- Acclimatation à la température (Kaplan et al., 2004).
- Agents de résistance aux sécheresses (Hernandez et al., 2004).
- Attracteurs de pollinisateurs, notamment en tant que pigments (Iwashina, 2003).
- Substances allélochimiques (communication influençant les organismes alentours, notamment dans des mécanismes de compétition ; Mamolos & Kalburtji, 2001 ; Kohli & Singh, 2001 ; Duke, 2007).

2.5 Pathogènes de bourdons

Les bourdons, à l'instar de tous les organismes au sein d'un écosystème, sont sujets à l'influence de divers facteurs biotiques. Ceux-ci sont représentés par des prédateurs, des parasites, des commensaux (Pouvreau, 1973 ; Pouvreau, 1974) ainsi que des maladies (Pouvreau, 1991).

Selon le type de pathogène, leur nombre et leur localisation (externe ou interne, notamment dans le tractus digestif ou les voies respiratoires), ces pathogènes peuvent avoir divers effets sur les bourdons : réduire leur activité, les affaiblir ou encore réduire leur fécondité ou leur reproduction (Pouvreau & Robert, 1989).

Selon Pouvreau et Robert (1989), il existe une grande diversité de pathogènes pouvant affecter les bourdons. Parmi ceux-ci, on peut citer des acariens (*Parasitellus sp.*, *Scutacarum acarorum*), des diptères (Conopidae dont les larves sont endoparasites), des nématodes (*Sphaerularia bombi*, endoparasite des reines qui les infecte durant la période d'hibernation), des fungi ou encore des protozoaires (*Nosema bombi*, *Crithidia bombi*).

3. Objectifs

Les interactions entre plantes hôtes, pollinisateurs et pathogènes de pollinisateurs sont en partie médiées par les métabolites spécialisés présents chez la plante hôte et consommés par le pollinisateur. Ces interactions étant prépondérantes dans la survie des trois parties, ces métabolites régissent donc en partie la valeur sélective de celles-ci. Ce mémoire se concentre sur les parties florales et plus précisément le pollen qui, contrairement aux parties végétatives, a jusqu'à lors peu été étudié.

L'objectif est, en premier lieu, d'effectuer une caractérisation chimique de pièces florales (corolle, pollen et nectar) ainsi que de feuilles de *Crataegus monogyna*, l'hypothèse étant d'observer des compositions significativement différentes au sein de ces parties.

En second lieu, la toxicité et les éventuelles vertus thérapeutiques des composés identifiés dans le pollen (sur base de caractérisations et de la littérature scientifique) seront évaluées. L'hypothèse est qu'en conditions saines du pollinisateur, les composés présentent une toxicité non nulle et réduisent la valeur sélective des individus ; alors qu'en conditions non-saines (individus parasités), les composés présentent un effet médicatif sur le pollinisateur.

Une série d'analyses chimiques et de bio-essais réalisés sur les modèles biologiques choisis permettront d'infirmer ou de confirmer ces hypothèses.

4. Matériel et méthode

4.1 Modèles biologiques

4.1.1 Pollinisateur : *Bombus terrestris*

L'espèce sélectionnée dans le cadre de ce travail est le bourdon terrestre (*Bombus terrestris* Linné, 1758). L'espèce comprend 9 sous-espèces reconnaissables par la coloration de leur corps (voir figure 9 ; Rasmont et al., 2008). Sa distribution, centrée sur la Méditerranée et s'étendant au Nord jusqu'à Helsinki et à l'Est jusqu'à l'Altaï, en fait l'une des espèces les plus abondantes de la région ouest-paléarctique (voir figure 9 ; Rasmont et al., 2008). De mars à octobre, il peut aisément être observé dans les nombreux milieux qu'il habite.

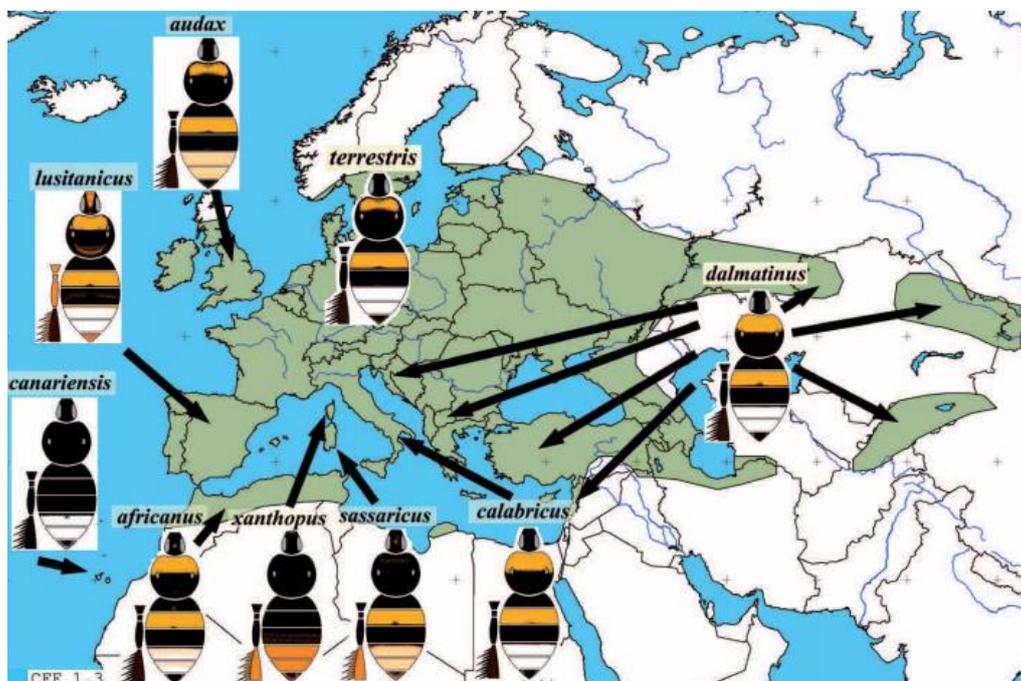


Figure 9 : Carte de distribution de *B. terrestris* et de ses différentes sous-espèces (Rasmont et al., 2008).

Etant une espèce hautement généraliste, elle est peu sujette au déclin et est même expansion en raison de sa domestication dans certains pays (Velthuis et al., 2002 ; Rasmont et al., 2008 ; Ghisbain et al., 2021).

Bombus terrestris représente un modèle de choix en tant qu'espèce polylectique sociale pour diverses raisons. Du fait de son abondance dans la nature et son important polylectisme (des centaines d'espèces différentes provenant de nombreuses familles ; Kleijn et al., 2008 ; Rasmont et al., 2008 ; Leonhart et al., 2012), il est un modèle robuste dans une étude qui se veut relativement généraliste dans son approche de conservation des

pollinisateurs. De plus, c'est une espèce commercialisée. L'élevage de celui-ci est aussi relativement facile et très documenté (Velthuis et al., 2006 ; Regali et Rasmont, 1995 ; Tasei et al., 2008). Pour finir, les ouvrières ne modifient pas la composition de la diète qu'elles administrent aux larves, ce qui permet d'observer un maximum les effets des traitements sur le développement des juvéniles (Pereboom, 2000).

4.1.2 Modèle d'angiosperme : *Crataegus monogyna*

L'aubépine à un style (*Crataegus monogyna*, Jacq.) appartient à la grande famille des Rosaceae. Elle est commune des régions tempérées de l'hémisphère Nord où elle y est cantonnée (Christensen, 1992a). C'est une espèce habituelle des lisières de forêts, bosquets et des haies (espèce pionnière). En Europe et ses environs, sa distribution s'étend au Nord à environ 63° sur les côtes de la mer du Nord (Mossberg & Stenberg, 2010) et jusqu'au Maghreb au Sud (Hegi, 1923). A l'Est, elle atteint la Volga et la mer Caspienne (Pojarkova, 1939) et se retrouve jusqu'au Nord et l'Irak où elle se raréfie (Browicz, 1972).

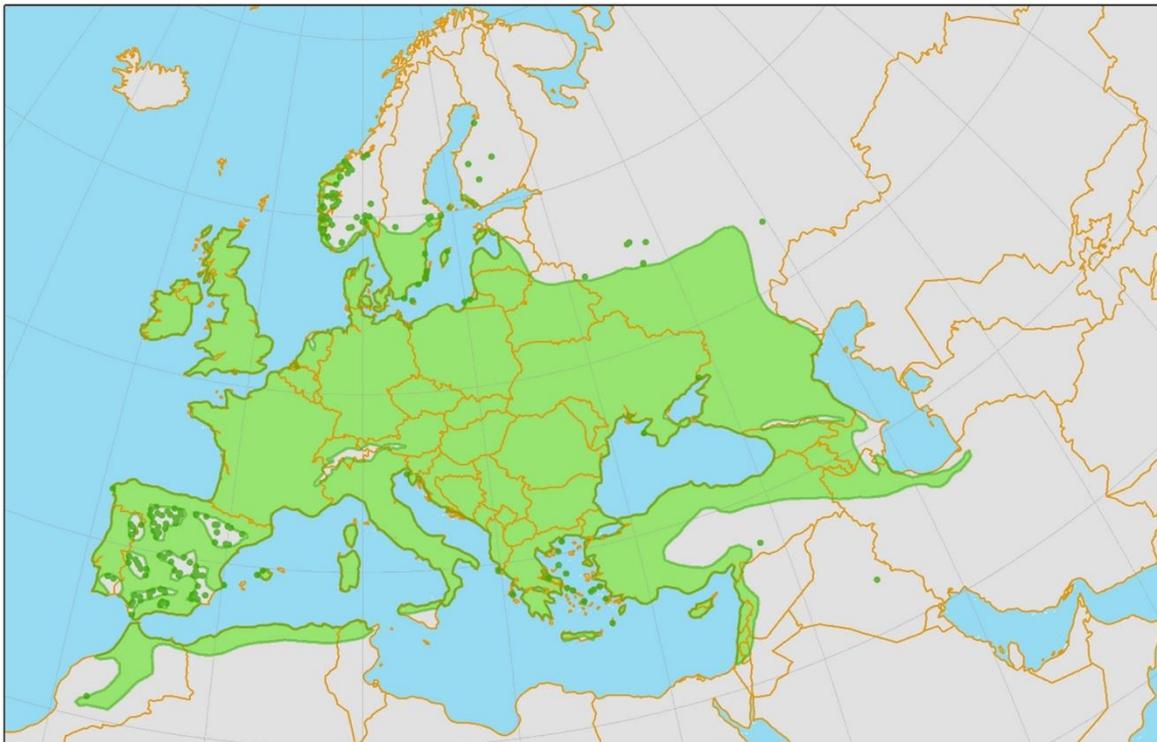


Figure 10 : distribution géographique de *C. monogyna* en Europe (d'après Meusel et al., 1965, redessiné par le Dr. Erik Welk).

C. monogyna apprécie les climats tempérés, Méditerranéens et continentaux (Fichtner & Wisseman, 2021). Cette espèce se retrouve sur à peu près tous les profils géologiques, qu'ils soient siliceux ou calcaires (Aeschimann, 2004) et sur un large panel de sols, avec une préférence pour les argiles et les loams, et les pH plutôt basiques (Hess, 1977).

Morphologiquement, l'aubépine est un arbuste de moins de 10 mètres habituellement, épineux et dont les feuilles sont caduques. Elle est différenciable de son espèce frère, *C. laevigata*, par ses fleurs à un style. Les fleurs, qui fleurissent d'avril à juin (Gyan & Woodell, 1987a), sont hermaphrodites, protogyne et pentamères, et sont présentées sur des inflorescences de cinq à dix fleurs. Elles attirent les pollinisateurs grâce à la coloration blanche de leurs pétales ainsi qu'à une odeur fétide. Ceux-ci sont récompensés par nectar et pollen (Ehlers, 1960). Le fruit est une drupe d'un rouge vif très apprécié des oiseaux et la dispersion se fait par endozoochorie.

C. monogyna est très étudiée dans la littérature scientifique. Elle est utilisée en médecine traditionnelle depuis des siècles contre les troubles cardiovasculaires et a longuement été étudiée en pharmacologie. L'essor de la recherche de composés bioactifs chez les plantes associé à sa notoriété en médecine traditionnelle a donné lieu à une étude approfondie de ses métabolites spécialisés et de leurs propriétés. Pour l'homme, elle présente des vertus anti-inflammatoires et serait utile contre les troubles cardiovasculaires (Nabavi et al., 2015). Néanmoins, ses effets sur les pollinisateurs demeurent globalement méconnus.

Parmi les groupes de molécules présents, les composés polyphénoliques, et plus particulièrement les flavonoïdes, ont été jugés intéressants pour leurs effets antioxydants (Keser et al., 2014 ; Bertanoniené et al., 2008 ; Bahorun et al., 2003) et antimicrobiens (Coimbra et al., 2020). De plus, d'autres études menées sur les autres représentants du genre *Crataegus* montrent des résultats antimicrobiens intéressants (Kostic et al., 2012 ; Bahri-Sahloul et al., 2014 ; Belkhir et al., 2013).

L'ensemble de ces éléments, des caractéristiques écologiques aux propriétés bioactives, font de *C. monogyna* un choix prometteur dans le cadre du projet ARC Métaflore et de ce mémoire.

4.1.3 Modèle de parasite : *Crithidia bombi*

Crithidia bombi (Kinetoplastida ; Trypanosomatidae) est un parasite infectieux de la partie postérieure de l'intestin des bourdons, où il se retrouve fixé comme à l'état libre. Il est susceptible d'infecter toutes les castes d'une colonie et se présente sous deux formes : une forme flagellée plutôt allongée et mobile (choanomastigote) ainsi qu'une forme plutôt ronde sans flagelle (amastigote) qui se fixe à l'épithélium digestif (figure 10 ; Lipa & Triggiani, 1980 ; Gorbunov, 1987).

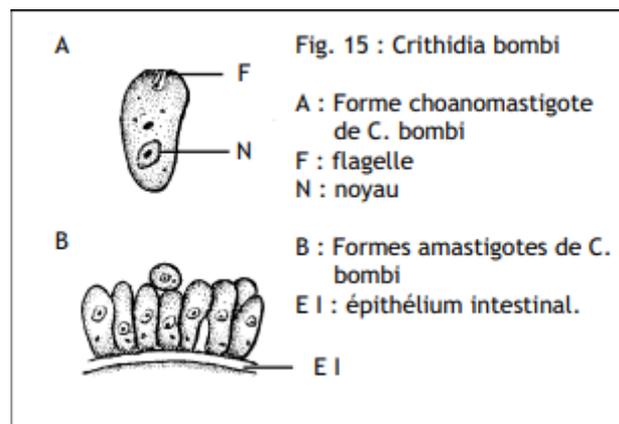


Figure 11 : les deux formes du parasite *Crithidia bombi* (d'après Pouvreau et Robert, 1989).

Les deux formes de *C. bombi* sont aisément identifiables au microscope optique, comme l'illustre l'image suivante :

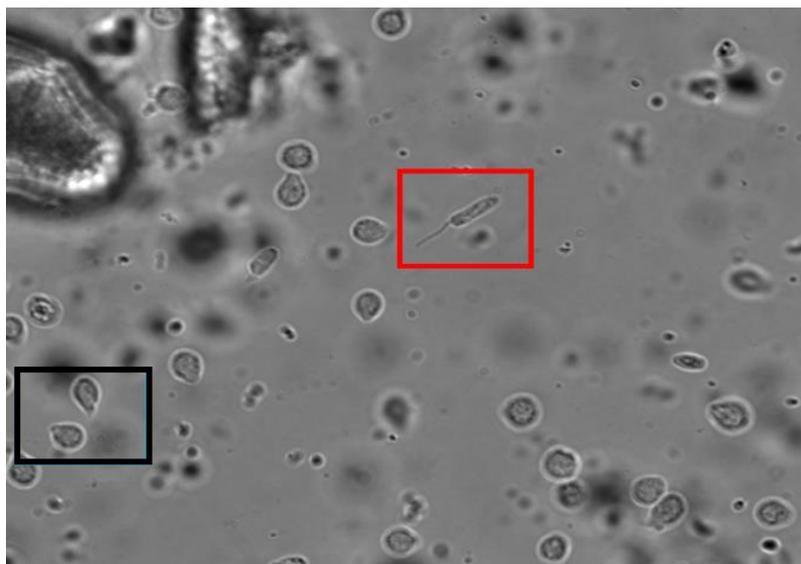


Figure 12 : photographie des différents stades de *C. bombi* en suspension dans une solution. Cadre inférieur gauche : forme amastigote, cadre supérieur droit : forme choanomastigote (norwichbumblebees.wordpress.com).

Les interactions parasitaires entre bourdons et *C. bombi* trouvent leur origine dans des phénomènes relativement simples. Les deux formes du parasite, présentes dans l'intestin postérieur, sont en partie expulsées dans les fèces des individus infectés. Ces fèces se déposent notamment sur les fleurs butinées, qui seront par la suite butinées par d'autres individus infectés à leur tour par ingestion du parasite. Certaines reines, infectées avant l'hibernation, permettront au parasite de survivre jusqu'à la saison prochaine (1). A la fin de la période de dormance, les reines, qui auront été infectées avant l'hibernation ou durant leur période de récolte de nourriture printanière (3), fonderont de nouvelles colonies abritant le parasite (2, 4). Les nouveaux individus participeront à la propagation du pathogène par leur récolte de nourriture (5). En fin de vie de la colonie, les mâles (6) ainsi que les jeunes reines infectées (7) quitteront le nid, et uniquement les jeunes reines participeront à la propagation comme décrit ci-dessus.

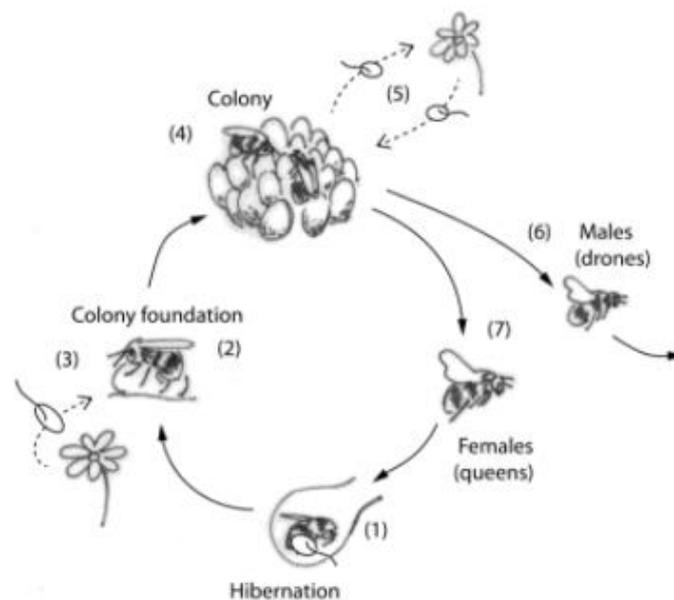


Figure 13 : Schéma de propagation de *C. bombi* au sein de population de bourdons (d'après Schmid-Hempel et al., 2019).

Ce parasite n'est pas directement mortel pour l'hôte mais joue de manière significative sur sa valeur sélective, participant donc partiellement à leur déclin. *C. bombi* réduit les capacités de l'hôte à récolter de la nourriture (Gegear et al., 2005), réduit ses chances de survie dans des conditions extrêmes (Brown et al., 2000) mais également les chances qu'ont les reines de fonder une colonie (Brown et al., 2003).

Crithidia bombi est largement répandu dans la nature, notamment au sein des populations de *B. terrestris* et a donc été relativement facile à collecter. Il est par la même occasion facile à manipuler, élever et maintenir en laboratoire. Les trypanosomes, dont fait partie le genre *Crithidia*, ont été considérablement étudiés par la communauté scientifique et les connaissances les concernant sont vastes (Gibson & Stevens, 1999 ; Tait & al., 2011). L'ensemble de ces critères font de *Crithidia bombi*, et plus particulièrement du système *C. bombi* – *B. terrestris*, un système de choix pour des expériences tant généralistes que spécifiques (Schmid-Hempel et al., 2019).

4.2 Caractérisation des flavonoïdes de l'aubépine

4.2.1 Collecte des échantillons

En premier lieu ont été récoltées les différentes parties de *C. monogyna* qui seraient analysées : les feuilles, le pollen, le nectar ainsi que les pétales. Cette diversité d'échantillons a permis d'obtenir une vue d'ensemble de la composition chimique de la plante et de mettre en lumière le contraste entre composition chimique des parties végétatives et reproductrice de la plante. Ces échantillons ont été récoltés sur 5 individus différents présents sur le long du chemin de l'Ermitage près du Mont Panisel à Mons durant le printemps 2020. Les feuilles et corolles ont été conservées à -80°C dans l'attente d'une lyophilisation avant analyses. Les échantillons de pollen et de nectar ont été conservés au -20°C et analysés frais.

4.2.2 Analyses chimiques

Tout d'abord, il a été nécessaire de cibler le groupe de molécules à étudier. Pour ce faire, des échantillons de pollen ont été analysés par HPLC - MS (ESI) (chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse avec ionisation par électronébuliseur). Des spectres MALDI ont également été réalisés. Ces méthodes ont donné une première ébauche des molécules à cibler, et le choix s'est porté sur les flavonoïdes. L'ensemble des analyses chimiques qui suivent ont été effectués par Irène Semay, doctorante au Laboratoire de Synthèse et spectrométrie de masse organiques (S2MOS) du Pr. Pascal Gerbaux de la Faculté des Sciences de l'UMONS.

Pour les feuilles et les corolles, les échantillons ont d'abord été broyés finement avec un broyeur Retsch® Mixer Mill MM 400 dans un bol en acier en utilisant une bille en acier de 2,5 cm de diamètre. Cinquante milligrammes de chaque échantillon ont par la suite été

suspendus dans 1 mL d'un mélange méthanol/eau (7:3) et laissés au bain à ultra-sons durant 30 min. Les tubes Eppendorf ont ensuite été centrifugés (Sigma 2-16P) à 4500 rpm durant 10 min. Un maximum de surnageant a été récupéré et filtré à l'aide d'un filtre pour seringue de 0,2 µm (Pall Acrodisc Syringe Filter with Nylon Membrane, 13 mm). Après filtration, 500 µL de filtrats sont précisément récupérés et séchés à 55°C durant trois heures. Le résidu est ensuite re-suspendu dans un mélange 7:3 méthanol/eau à une concentration adéquate pour l'analyse par HPLC-MS.

Pour le pollen, 50 mg de chaque échantillon ont été suspendus dans 1 mL d'un mélange méthanol/eau 7:3 puis passés au broyeur Retsch® Mixer Mill MM 400, cette fois en solution avec 5 billes en verre de 2 mm de diamètre. Le broyage se fait à 30 Hz durant 2 minutes. Les échantillons subissent ensuite le même procédé que précédemment décrit pour les feuilles et corolles (centrifugation, filtration, dilution).

Pour le nectar, les tubes ont préalablement été centrifugés durant 1 min à 1000 rpm pour rassembler l'échantillon dans le fond du tube. L'entièreté du nectar est ensuite ajoutée dans 200 µL d'un mélange 7:3 méthanol/eau préalablement pesés. La solution est ensuite homogénéisée aux ultra-sons avant analyse.

Les différents extraits ont été analysés par HPLC – MS (ESI). Un gradient binaire a été réalisé à un débit de 0,25 mL min⁻¹. La phase mobile était constituée de méthanol (solvant A) et d'eau + 0,01 % d'acide formique (solvant B). Le programme de gradient était le suivant : A = 10 %, B = 90 % à t = 0 min ; A = 30 %, B = 70 % à t = 6 min ; A = 35 %, B = 65 % à t = 11 min ; A = 50 %, B = 50 % à t = 18 min ; A = 90 %, B = 10 % à t = 23 min ; A = 100 %, B = 0 % à t = 25 min ; A = 100 %, B = 0 % à t = 27 min, A = 10 %, B = 90 % à t = 30 min. La température de la colonne a été maintenue à 40°C et celle de l'échantillonneur automatique à 20°C. Le volume d'injection était de 5 µL. Le spectromètre de masse fonctionnait en ionisation électrospray (ESI) en mode négatif sur une plage de masse de 50 à 2 000 Da. Les conditions MS étaient : tension capillaire de 3,1 kV (2,5 kV pour le nectar), tension au cône de +30 V (+40 V pour le nectar), température de la source de 120 °C, la température et le débit du gaz de désolvatation de 300 °C et 500 L/h, respectivement, et durée de balayage de 0,5 s. Les flavonoïdes des parties végétatives et du pollen ont été séparés via une colonne Phenomenex® Kinetex C18 EVO (150 × 2,1 mm de diamètre intérieur, 100 de granulométrie) à l'aide d'un système Waters™ Alliance 2695, puis analysés via un spectromètre de masse

Waters™ Q-ToF US, tandis que les flavonoïdes du nectar ont été analysés à l'aide d'un système Waters™ Acquity UPLC H-Class (mode HPLC) et d'un spectromètre de masse Waters™ Synapt G2-Si pour une plus grande sensibilité. Le standard utilisé en vue des quantifications est la rutine pour le pollen et le nectar et la quercétine-3,4''-O-diglucoside pour les feuilles et les pétales (évitant les interférences entre la rutine et des ions présents dans ces parties).

4.3 Essais biologiques

4.3.1 Plan expérimental

Afin de tester l'impact du pollen d'aubépine et de ses flavonoïdes sur la valeur sélective de bourdons sains et la charge parasitaires de bourdons infectés, différents traitements ont été établis (Tab. 6).

Tableau 4 : récapitulatif des 6 différents traitements.

Référence du traitement	Pollen d'aubépine	Pollen de saule (ctrl)	Pollen d'aubépine + flavo	Crithidia
ARC2 B		X		X
ARC3 A		X		
ARC3 E			X	
ARC3 F			X	X
ARC4 C	X			
ARC4 D	X			X

Chacun des 6 traitements a été testé indépendamment dans le cadre de bio-essais sur *B. terrestris*. Des micro-colonies (individus isolés dans un espace clos et formant un couvain, illustrant une colonie à petite échelle) de 5 ouvrières ont été formées. Chaque traitement s'est vu attribuer 15 répliques provenant de 5 colonies mères différentes de manière parfaitement croisée et homogène. De cette manière, non seulement les répliques permettaient de diminuer l'effet du hasard sur le déroulement de l'expérience, mais les origines diverses des ouvrières augmentaient la diversité génétique des individus, limitant ainsi les résistances individuelles éventuelles.

En résumé, pour chaque traitement (6) et pour chaque colonie mère (5), 3 micro-colonies ont été formées, pour un total de $6 \times 5 \times 3 = 90$ micro-colonies.

Afin de reproduire au mieux les conditions sur le terrain, les micro-colonies ont été disposées dans une salle dont les conditions sont les suivantes :

- Température maintenue entre 25 et 28°C environ
- Humidité relative maintenue entre 50 et 70% environ
- Noir complet (hors manipulations)

Une fois les micro-colonies formées, celles-ci ont subi une phase d'initiation. Cette initiation consistait à fournir, le premier jour et à chaque micro-colonie, 1g de diète de saule (telle que décrite ci-dessous) et ensuite de laisser les choses se faire durant jours. Ceci a permis aux micro-colonies et à leurs couvains de démarrer de manière optimale en limitant les divers stress avant le début de l'expérience et des mesures.

Ensuite, la phase d'élevage et de nourrissage a débuté. Chaque micro-colonie fut nourrie dans des conditions « ad libitum » en sirop (eau/sucre en 40/60, w/w) ainsi qu'en diète en fonction du traitement attribué, et ce tous les deux jours durant 35 jours. Ce laps de temps fut choisi pour s'assurer de l'émergence de suffisamment de mâles pour chaque traitement. Au bout de 35 jours, tous les individus (ouvrières et mâles) de chaque colonie furent isolés et tués. Quant aux couvains, ils furent disséqués. Tout au long de l'expérience, les conditions physicochimiques dans la salle furent relevées.

4.3.2 Diètes polliniques

Dans le cadre de ce travail, trois diètes polliniques différentes ont été testées :

(1) Diète à base de pollen d'aubépine

En ce qui concerne les essais biologiques, les quantités de pollen requises rendent impossibles les collectes manuelles sur plantes. Le pollen d'aubépine a été acheté auprès du fournisseur Aristée® et est certifié biologique. Afin de s'assurer d'une pureté maximale, les pelotes de pollen ont été manuellement triées puis broyées pour obtenir une poudre homogène. Au total, environ 1,5kg de pollen d'aubépine trié a été utilisé pour les essais biologiques. La diète à base de pollen d'aubépine permet d'éventuellement mettre en lumière les effets du pollen dans son entièreté, non supplémenté. Celui-ci contient

naturellement les flavonoïdes présents dans le pollen mais aussi d'autres métabolites spécialisés non ciblés. La recette est faite à base de pollen d'aubépine, d'eau, d'un mélange d'eau/éthanol 1 : 1 ainsi que d'un mélange eau/sucre 40 : 60 (w/w).

(2) Diète à base de pollen de saule (contrôle positif)

Le pollen de saule (*Salix sp.*) a été acheté auprès des Ruchers de Lorraine. Celui-ci, particulièrement apprécié par *B. terrestris*, représente un contrôle positif fiable pour la diète contrôle. Comme pour l'aubépine, les pelotes de pollen ont été finement broyées et homogénéisées avant les essais. Cette diète sert de témoin aux résultats qui seront obtenus. Celle-ci est composée de pollen de saule, d'eau, d'un mélange d'eau/éthanol 1 : 1 ainsi que d'un mélange eau/sucre 40 : 60 (w/w).

(3) Diète à base de pollen de saule supplémenté en flavonoïdes

A l'aide d'un protocole d'extraction similaire à celui utilisé lors des analyses fines, mais à plus grande échelle, un extrait de flavonoïdes a été préparé sur base de 600 g de pollen d'aubépine. Le pollen a été extrait à l'aide de méthanol durant 30 h à l'aide d'extracteurs de Soxhlet. La solution a ensuite été filtrée grâce à un entonnoir Büchner, évaporée puis remise en solution dans un mélange 1 : 1 d'eau et dichlorométhane afin de solubiliser et séparer les composés solubles dans les solvants polaires et apolaires, les flavonoïdes se retrouvant dans le solvant polaire (l'eau). Après un partitionnement de 24h, la phase aqueuse a été récupérée et évaporée. Le résidu obtenu a ensuite été solubilisé dans le méthanol avec une dilution adéquate pour l'analyse par HPLC-MS. L'extrait brut a pu être quantifié à l'aide d'une solution standard d'isoquercétine. Des quantifications ont également été réalisées sur le pollen d'aubépine et saule (Tab. 5).

Tableau 5 : valeur des quantifications en flavonoïdes dans les 3 sources utilisées dans les traitements.

Source	Valeur
Pollen d'aubépine	17,54 +/- 0,80 mg/g pollen
Pollen de saule	10,96 +/- 1,66 mg/g pollen
Extrait de flavonoïdes	36,45 +/- 0,37 mg/g d'extrait

Cet extrait a permis de réaliser une diète à base de pollen de saule supplémentée en flavonoïdes d'aubépine. Cette diète a pour but de tester uniquement les flavonoïdes présents dans le pollen d'aubépine, indépendamment des autres métabolites présents dans ce pollen. Les flavonoïdes présents dans le pollen de saule en quantités moindres forment un biais qui sera en partie pondéré par le fait que les teneurs en flavonoïdes de ce pollen soient connus ainsi que par le test de la diète contrôlée.

Chacune des trois diètes décrites fut testée dans des conditions de présence de parasite (*C. bombi*) ou non, donnant ainsi lieu aux 6 traitements décrits précédemment (voir tableau 4). De cette manière, non seulement la toxicité des composés ciblés a pu être évaluée (absence de parasites) mais également les éventuels effets thérapeutiques ou d'affaiblissement de ceux-ci en présence de parasites. Le détail de la composition de chacun des diètes est fourni dans le tableau 6.

Tableau 6 : proportions des 3 diètes décrites dans le cadre du travail.

	Aubépine	Saule	Saule + Flavo aubépine
Pollen (g)	15	15	15
Sirop (gouttes)	8	8	
Eau : Ethanol (mL)	1,5	1,5	
Eau (mL)	8	5,5	
Extraits Flavo (mL)			7
Masse candy	24,73	22,23	23,57
µL éthanol/g candy	30	34	34
g pollen/g candy	0,61	0,67	0,64
mg flavo/ candy	10,64 +/- 0,486		10,338

4.3.3 Traitements impliquant les parasites

A. Collecte

Avant tout, il a été nécessaire de collecter des reines infectées *in natura*. Neuf reines ont ainsi été capturées, et l'inspection au microscopique optique des fèces ont montré qu'une partie d'entre elles était infectée. Ces reines ont ensuite été infectées entre elles dans le but d'uniformiser la population de *C. bombi* et d'augmenter la charge parasitaire des reines

hôtes. Pour ce faire, il suffisait d'isoler les hôtes, de récolter leur fèces, de les mettre en solution dans du sirop (eau sucrée) et de nourrir chaque hôte avec cette solution sucrée. Cette étape permettait d'avoir une source sûre de parasites. Elle permettait aussi, grâce aux plusieurs reines infectées prélevées sur le terrain, d'avoir un pool génétique plus large, prévenant ainsi les éventuelles résistances ponctuelles génétiques.

Ensuite, 5 colonies d'approximativement 150 ouvrières chacune (obtenues chez BIOBEST GROUP NV) ont été inoculées en suivant le même principe. Cette étape a été répétée jusqu'à obtention de populations de parasites en quantités satisfaisantes. A chaque répétition, les fèces d'un maximum d'individus infectés (reines et/ou ouvrières des nouvelles colonies) ont été utilisées. Trois colonies ont montré des charges parasitaires satisfaisantes (évaluées par observation des fèces d'un échantillon représentatif d'individus, environ 20, pour chaque colonie).

B. Purification et quantification

Une fois avoir obtenu une population de parasites satisfaisante (par inoculations répétées tel que décrit ci-dessus), les fèces de nombreux individus des trois colonies ont encore une fois été récoltées. Elles ont ensuite été purifiées en suivant la méthode de triangulation mise au point par Baron et al., 2014, et décrite de manière complète par Martin et al. (2018). Cette méthode permet de purifier la solution en cellules de *C. bombi* et de la débarrasser de ses impuretés (débris et bactéries).

Les fèces récoltées ont d'abord été placées dans un tube Eppendorf (tube 1) et diluées dans une solution saline (NaCl 0,9%) pour arriver à 1mL de solution totale. Cette solution a subi une centrifugation à 0,8g durant 2 minutes. Le surnageant résultant a par la suite été transféré dans un nouveau tube (tube 2). Le culot (tube 1) a quant à lui été dilué à nouveau dans 1mL de solution saline. Les tubes 1 et 2 ont été centrifugés à 0,8g durant 2 minutes. Le surnageant du tube 2 a été transféré dans un nouveau tube (tube 3) et celui du tube 1 a été transféré dans le tube 2. Le culot restant du tube 1 a de nouveau été solubilisé dans 1mL de solution saline. Les tubes 1, 2 et 3 ont ensuite subi une centrifugation à 0,8g durant 2 minutes. Le processus fut répété jusqu'à l'obtention de 8 tubes Eppendorf.

Pour finir, les tubes 4, 5 et 6 furent centrifugés à 8g durant 1 minute avant d'être débarrassés de leurs surnageants respectifs. Le culot du tube 4 fut suspendu à nouveau dans

100 μ L. Cette solution fut transférée dans le tube 5, et la solution ainsi que le culot du tube 5 furent homogénéisés. Enfin, la solution du tube 5 fut transférée dans le tube 6, le culot de ce tube fut également solubilisé et l'ensemble fut homogénéisé.

Il a ensuite fallu connaître la concentration en cellules de *C. bombi* de la solution obtenue dans le tube 6, afin d'être en mesure d'effectuer une inoculation uniforme de nos futures micro-colonies. Pour ce faire, une cellule de Neubauer fut utilisée et observée au microscope à contraste de phase.

Une cellule de Neubauer est un hématimètre qui, observé au microscope, permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Concrètement, c'est une lame quadrillée subdivisée en carrés de différentes tailles définies et d'une profondeur également définie (voir figures 13 et 14). Avec donc une surface par carré et une profondeur du puits fournies, il est possible de calculer précisément la concentration en cellules de la solution (en cellules/ μ L).

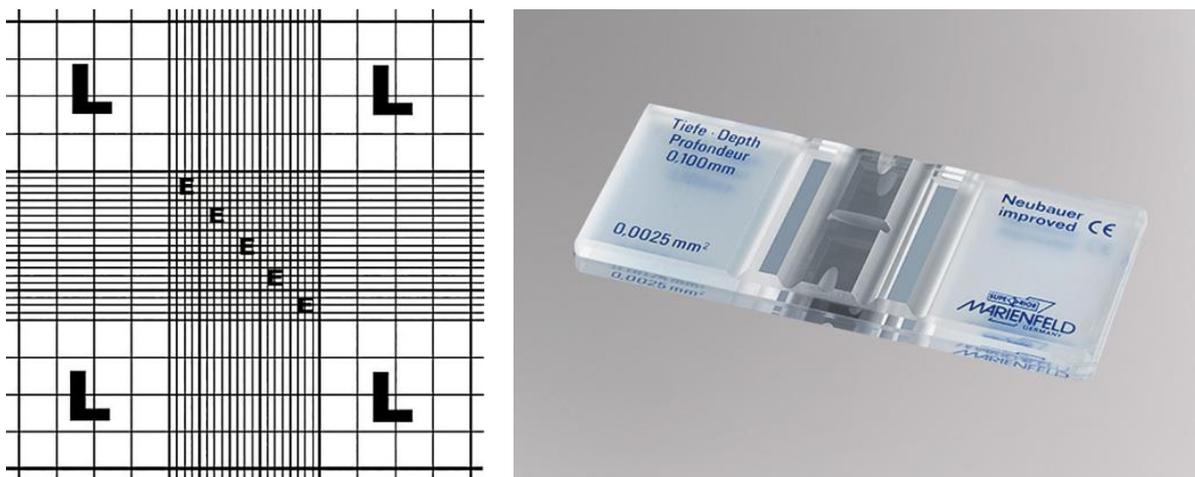


Figure 13 : (a) schéma d'une cellule de Neubauer et de ses subdivisions (www.Carlroth.com) ; (b) image d'une cellule de Neubauer à l'œil nu (www.dutscher.com).

Ici, ce sont les carrés E centraux (voir figure #) qui ont été utilisés. Les cellules de chaque carré ont été comptées séparément puis la moyenne fut calculée, suivie de la concentration de la solution. La concentration de celle-ci fut ajustée avec une solution sucrée 40% pour obtenir 2 500 cellules/ μ L.

C. Inoculation

Les ouvrières nécessitant une inoculation ont été isolées individuellement de leurs colonies respectives dans une cage NICOT et affamées durant approximativement 3 heures. Chacune a ensuite été nourrie de 10 μ L de l'inoculum préparé précédemment, arrivant à une ingestion totale de 25 000 cellules par hôte. Un nombre d'individus supérieur aux besoins du travail fut isolé afin de s'assurer que le nombre d'individus inoculés final soit suffisant.

4.4 Paramètres mesurés

4.4.1 Développement et collecte de ressources des micro-colonies

L'ensemble des paramètres furent mesurés indépendamment sur chaque micro-colonie.

D'une part, durant les 35 jours d'élevage, l'ensemble de ces paramètres furent mesurés :

- Les collectes en pollen et en sirop, mesurées tous les deux jours et exprimées en grammes, qui permettent d'établir une dynamique de collecte tout au long de l'élevage. Ces données donnent un indice sur la consommation des ressources au sein de chacune des micro-colonies.
- Le taux d'éjections larvaires qui reflète en partie le stress induit par les traitements.
- Les mortalités des ouvrières, qui reflètent également en partie le stress induit par les traitements.
- Le nombre de mâles émergés ainsi que le jour de l'émergence, indiquant en partie les performances de chaque micro-colonie.

D'autre part, les dissections des micro-colonies à la suite des 35 jours d'élevage permettent de mesurer des paramètres complémentaires liés au développement des micro-colonies:

- La masse et le nombre des différents stades au sein du couvain (œufs, larves non-isolées, larves isolées pré-défécation, larves isolées post-défécation, pupes et mâles non-émergés), indiquant partiellement la valeur sélective de chaque micro-colonie.
- La masse de chaque mâle émergé, donnant également une indication sur la valeur sélective de chaque micro-colonie.

Divers paramètres furent également calculés sur base des mesures effectuées :

- L'efficacité pollinique (masse du couvain / masse totale de pollen consommée (g)), qui est une réponse au stress induit par les traitements.
- La dilution pollinique (sirop total consommé (g) / pollen total consommé (g)), également une réponse au stress.

Toutes les données massiques (collecte de sirop et de pollen, poids des différents stades larvaires produits et poids total du couvain) ont été standardisées par la masse des ouvrières afin d'éviter tout biais lié au soin plus important ayant été prodigué par des ouvrières de plus grande taille.

4.4.2 Suivi de la charge parasitaire

A l'aide de la chambre de Neubauer et d'un microscope à contraste de phase (permettant une visibilité accrue par rapport à un microscope optique conventionnel), la charge parasitaire des micro-colonies fut mesurée tous les 3 jours durant les 35 jours d'expérimentation en suivant la méthode décrite précédemment. Pour ce faire, 3 ouvrières de chaque micro-colonie parasitée ont été sélectionnées aléatoirement et leurs fèces furent analysées, la moyenne des comptages des 3 individus correspondant à la charge parasitaire de la micro-colonie à un instant t.

4.4.3 Mesures du corps gras

Les corps gras abdominaux des insectes sont à l'origine de la synthèse de métabolites impliqués dans le système immunitaire tels que les peptides anti-microbiens, moyens de défense contre les microbes pathogènes (Hoffmann & Richhart, 1997 ; Choi et al., 2008). En d'autres termes, la synthèse de métabolites impliqués dans le système immunitaire consomme les corps gras. Mesurer les corps gras des individus après traitement offre donc un indice sur l'activité immunitaire de ceux-ci.

Les mesures s'effectuent selon Ellers (1996). Pour chaque micro-colonie, 2 mâles ainsi que 2 ouvrières furent pesés un par un. Les abdomens furent prélevés puis pesés également. Ces abdomens ont ensuite été mis à sécher à 70°C en étuve durant 3 jours puis pesés à nouveau. Les abdomens furent placés dans 2 mL d'éther diéthylique durant 24 heures afin d'extraire les corps gras, rincés deux fois à l'éther diéthylique et pesés à nouveau après un séchage de

7 jours en étuve à 70°C. La masse des corps gras abdominaux fut déterminée à partir de la différence entre les masses sèches initiales (après 3 jours de séchage) et finales des abdomens, standardisée par la masse des abdomens avant toute manipulation.

4.5 Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques et des représentations graphiques ont été réalisées sur le logiciel RStudio (version 3.5.3) SciViews Box 2019 (version 1.0).

4.5.1 Flavonoïdes de l'aubépine

Afin d'analyser les concentrations globales en flavonoïdes des parties de plantes de nos différents individus, une analyse de la variance à un facteur fut effectuée (One Way ANOVA). Ce test a permis de comparer les teneurs en flavonoïdes des différentes parties de plantes. Ce test paramétrique doit répondre à différentes conditions : (i) échantillonnage aléatoire, (ii) observations indépendantes, (iii) homoscedasticité ou égalité des variances (i.e. test de Bartlett, H_0 = égalité des variances ; fonction « bartlett.test », package « stats ») et (iv) distribution normale des résidus (i.e. test de Shapiro, H_0 = distribution normale ; fonction « shapiro.test », package « stats »). Si l'une des conditions n'est pas respectée, il est nécessaire d'utiliser le test de Kruskal-Wallis (fonction « kruskal.test », package « stats »), équivalent non paramétrique.

Lorsque le test statistique retourne une p-value inférieur au seuil alpha, un test post-hoc peut être réalisé (fonction « kruskalmc », package « pgirmess ») afin de structurer les données et d'évaluer les différences significatives entre les parties de plantes. Ensuite, les résultats ont été visualisés à l'aide d'un boxplot (fonction « ggboxplot », package « ggpubr »).

Pour analyser les proportions de composés, une perMANOVA (analyse ANOVA en multivarié en permutations ; fonctions « adonis » et « pairwise.adonis », package « vegan ») fut effectuée. Au préalable, les concentrations ont été transformées en pourcentages. Ensuite, une distance de Bray-Curtis fut utilisée (fonction « vegdist », package « vegan ») pour analyser les dissimilarités entre les parties de plantes. Pour finir, une analyse IndVal (fonction « indval », package « labdsv ») a permis de mettre en lumière les composés indicateurs de chaque partie.

4.5.2 Données issues des essais biologiques

Les données issues des essais biologiques ont été analysées en utilisant divers modèles linéaires généralisés mixtes (fonctions « lmer » et « glmer », package « lme4 »). Ceux-ci permettent d'analyser une variable en fonction d'effets fixes mais aussi d'effets aléatoires, en utilisant différentes distributions. Dans ce cas, les variables « diète » et « parasite » ont été posées comme effets fixes croisés tandis que la variable « colonie mère » fut posée en tant que variable aléatoire pour contrôler l'effet colonie. Différents modèles de distribution ont été utilisés en fonction de la nature des données analysées : (i) les données de quantitatives furent analysés suivant un modèle gaussien, ou suivant une distribution gamma si les résidus ne suivaient pas une distribution normale ; (ii) les données de type mortalité furent analysées suivant un modèle binomial ; (iii) un modèle de distribution de poisson pour les données de dénombrement (avec la variable « micro-colonie » en facteur aléatoire imbriqué dans le facteur colonie dans les cas de surdispersion des données) (fonction « overdisp_fun », package « lme4 »). Ensuite, un test de Wald de type 2 fut effectué afin d'obtenir une valeur de χ^2 , indiquant l'effet des différentes variables fixes, ou une interaction entre celles-ci (fonction « anova », package « lme4 »). Pour finir, des tests post-hoc furent réalisés afin d'évaluer les différences significatives entre les niveaux de la variable significative (fonction « glht », package « multcomp »). Les différents résultats sont visualisés à l'aide de dotplots (fonction « ggerrorplot », package « ggpubr »). Les mesures de corps gras ont été analysées après une transformation arcsin des données exprimées en pourcentages.

Les données de suivi (collecte de sirop et de pollen, charge parasitaire) ont été analysées grâce à des modèles linéaires généralisés mixtes à mesures répétées, en ajoutant le facteur temps parmi les effets fixes. A la suite de cela, un test de Wald de type 3 fut réalisé, mettant en lumière les effets des variables fixes. Les données furent visualisées à l'aide d'un graphique de type scatterplot particulier (fonction « ggplot », package « ggplot2 »).

5. Résultats

5.1 Analyses chimiques

5.1.1 Analyses fines

Les analyses fines ont permis de mettre en lumière les molécules contenues dans les différentes parties d'aubépine étudiées : la corolle, les feuilles, le pollen et le nectar. 17 molécules distinctes ont été caractérisées. Pour chacune d'entre elles furent attribués une formule brute, une masse moléculaire mesurée ainsi que l'erreur sur cette mesure, et si possible une nomenclature.

Tableau 7 : composés identifiés dans les parties d'aubépine étudiées (les composés dont la nomenclature est inconnue sont nommés I(1 – 4) pour des questions de clarté).

Partie	Masse moléculaire mesurée	Erreur	Formule brute	Nomenclature
Pollen	639,1569	1,3	C28H32O17	Méthoxyquercétine-3-O-dihexoside
Pollen	623,1623	1,8	C28H32O16	Méthoxyquercétine-3-O-hexosylrhamnoside
Pollen	463,0882	1,1	C21H20O12	Quercétine-3-O-hexoside
Pollen	477,1056	4,8	C22H22O12	Méthoxyquercétine-3-O-hexoside
Pollen	563,1043	1,1	C25H24O15	Méthoxyquercétine-O-malonylhexoside
Pollen	725,1619	7,4	C31H34O20	Méthoxyquercétine-O-malonylhexosylhexoside
Feuilles	577,1563	1	C27H30O14	Vitexine-O-rhamnoside
Feuilles	463,0934	12,3	C21H20O12	Quercétine-3-O-hexoside
Feuilles	609,1478	3,6	C27H30O16	Quercétine-3-O-hexosylrhamnoside
Feuilles	619,1656	1,1	C29H32O15	Vitexine-O-acétylrhamnoside
Feuilles	431,1018	9,3	C21H20O10	Vitexine
Feuilles	705,1667	4,5	C32H34O18	Apigénine-C-malonylhexosylacétylrhamnoside
Corolle	577,1577	3,3	C27H30O14	Vitexine-O-rhamnoside
Corolle	463,0902	5,4	C21H20O12	Quercétine-3-O-hexoside
Corolle	609,1446	1,3	C27H30O16	Quercétine-3-O-hexosylrhamnoside
Corolle	433,0784	3	C20H18O11	Quercétine-O-pentoside
Corolle	447,0927	0	C21H20O11	Kaempférol-3-O-hexoside
Corolle	593,1515	1,5	C27H30O15	I4
Corolle	623,1612	1,8	C28H32O16	I2
Corolle	619,1671	1,9	C29H32O15	Vitexine-O-acétylrhamnoside
Corolle	301,0382	11,3	C15H10O7	Quercétine
Corolle	563,1094	10,1	C25H24O15	Méthoxyquercétine-O-malonylhexoside
Nectar	477,1032	0,2	C22H22O12	I1

Nectar	577,1558	0,2	C27H30O14	Vitexine-O-rhamnoside
Nectar	623,1633	2,4	C28H32O16	I2
Nectar	639,1557	0,6	C28H32O17	I3
Nectar	563,1047	1,8	C25H24O15	Méthoxyquercétine-O-malonylhexoside

5.1.2 Concentrations totales en flavonoïdes des différentes parties

Le test de Kruskal-Wallis révèle que les concentrations en flavonoïdes des parties de plantes sont significativement différentes ($\chi^2 = 17,583$, ddl = 3, $p < 0.001$; Fig. 14). Le test post-hoc montre que les concentrations totales du pollen et des feuilles ne sont pas significativement différentes. Cependant, les concentrations de la corolle et du nectar diffèrent significativement. Le nectar présente une concentration en flavonoïdes nettement inférieure aux autres parties.

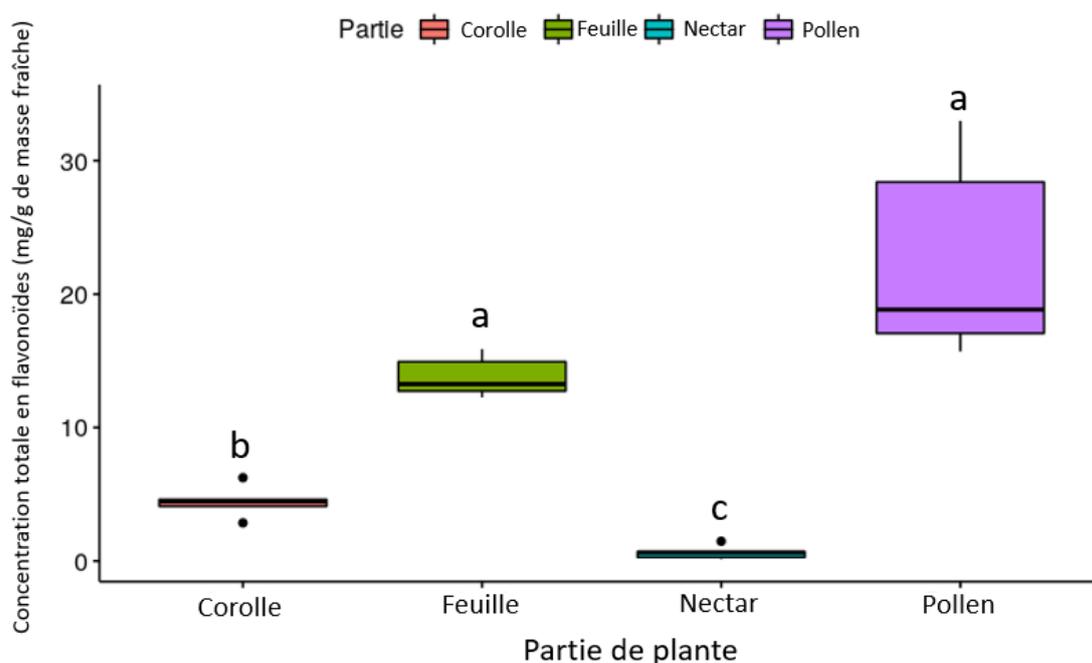


Figure 14 : Boxplot des concentrations en flavonoïdes des différentes parties de plantes chez les 5 individus. Les lettres correspondent aux différences significatives.

Tableau 8 : médianes, minima et maxima des concentrations en flavonoïdes des différentes parties de plantes (mg/g).

Partie	Médiane	Min.	Max.
Corolle	15,8	10,09	22,06

Feuille	24,78	22,92	29,66
Nectar	0,65	0,15	1,48
Pollen	18,84	15,7	32,98

5.1.3 Proportions des composés

La permANOVA indique qu'il y a une différence significative de composition chimique entre les différentes parties de plantes (Somme des carrés = 17.0718, carré des moyennes = 5.6906, F.Model = 247.95, ddl = 3, $p < 0,001$). Les tests de comparaison multiple indiquent que toutes les parties de plantes ont des compositions chimiques en flavonoïdes significativement différentes ($p < 0,01$).

Les analyses IndVal montrent que certains composés sont jugés indicateurs fiables de telle ou telle partie de plante. Autrement dit, les concentrations en ces composés sont représentatifs de la composition chimique d'un organe donné. Le coefficient d'indicateur (entre 0 et 1) correspond à la significativité du composé. Plus l'indice est proche de 1 et plus il est indicateur, et inversement (voir tableau #).

Tableau 8 : composés indicateurs des différentes parties de plantes selon les analyses IndVal.

Composé	Coefficient	Partie de plante concernée	p-value
Quercétine-O-pentoside	1.0000	Corolle	0,017
Kaempférol-3-O-hexoside	1.0000	Corolle	0,017
Quercétine-3-O-hexoside	0.8763	Corolle, feuilles, pollen	0,017
Quercétine-3-O-hexosylrhamnoside	0.7245	Corolle, feuilles	0,017
I4	0.6000	Corolle	0,017
Quercétine	0.6000	Corolle	0,017
Vitexine	1.0000	Feuilles	0,017
Apigénine-C-malonylhexosylacétylrhamnoside	1.0000	Feuilles	0,017
Vitexine-O-acétylrhamnoside	0.8501	Feuilles, corolle	0,017
I1	1.0000	Nectar	0,017
I3	1.0000	Nectar	0,017
I2	0.6774	Corolle, nectar	0,017
Vitexine-O-rhamnoside	0.6112	Corolle, feuilles, nectar	0,017

Méthoxyquercétine-3-O-dihexoside	1.0000	Pollen	0,017
Méthoxyquercétine-3-O-hexosylrhamnoside	1.0000	Pollen	0,017
Méthoxyquercétine-3-O-hexoside	1.0000	Pollen	0,017
Méthoxyquercétine-O-malonylhexoside	0.8407	Corolle, nectar, pollen	0,017

5.2 Collecte des ressources

Pollen

Les analyses révèlent une interaction significative entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 257,85$, $df = 5$, $p < 0,001$). Les comparaisons multiples révèlent que les micro-colonies saines nourries au saule ont collecté significativement plus de pollen que les autres (Fig. XX). Même parasitées, les micro-colonies nourries au saule collectent plus de pollen que les micro-colonies parasitées nourries sur aubépine et saule supplémenté. Leur collecte est d'ailleurs équivalente à celles des micro-colonies saines nourries sur aubépine et saule supplémenté. Il est intéressant de constater que l'interaction entre les effets « diète » et « parasite » est ici majoritairement due au fait que seules les micro-colonies parasitées nourries au saule diminuent significativement leur collecte de pollen comparées aux micro-colonies saines nourries sur la même diète. Pour les autres diètes polliniques, la présence de parasites n'influence pas significativement la collecte de pollen.

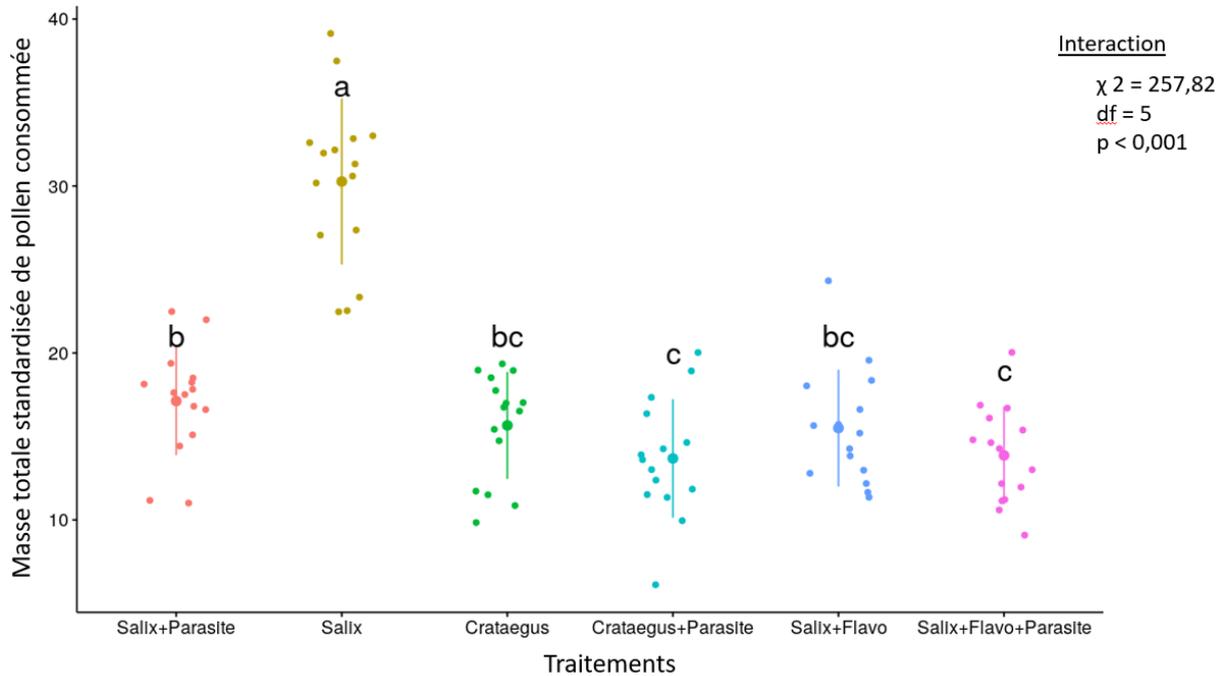


Figure 15 : Graphique de la masse totale standardisée de pollen consommée en fonction du traitement. Les petits points représentent l'efficacité pollinique de chaque micro-colonie, les gros points représentent l'efficacité moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitements.

Si l'on considère la dynamique de collecte, les analyses montrent une interaction significative entre le traitement et le jour ($F(5 ; 1419,04) = 8,8965, p < 0,001$) (Fig. 16). Le graphique permet effectivement de constater que l'augmentation de la collecte de pollen au cours du temps est plus importante pour les micro-colonies saines nourries au saule que pour les autres.

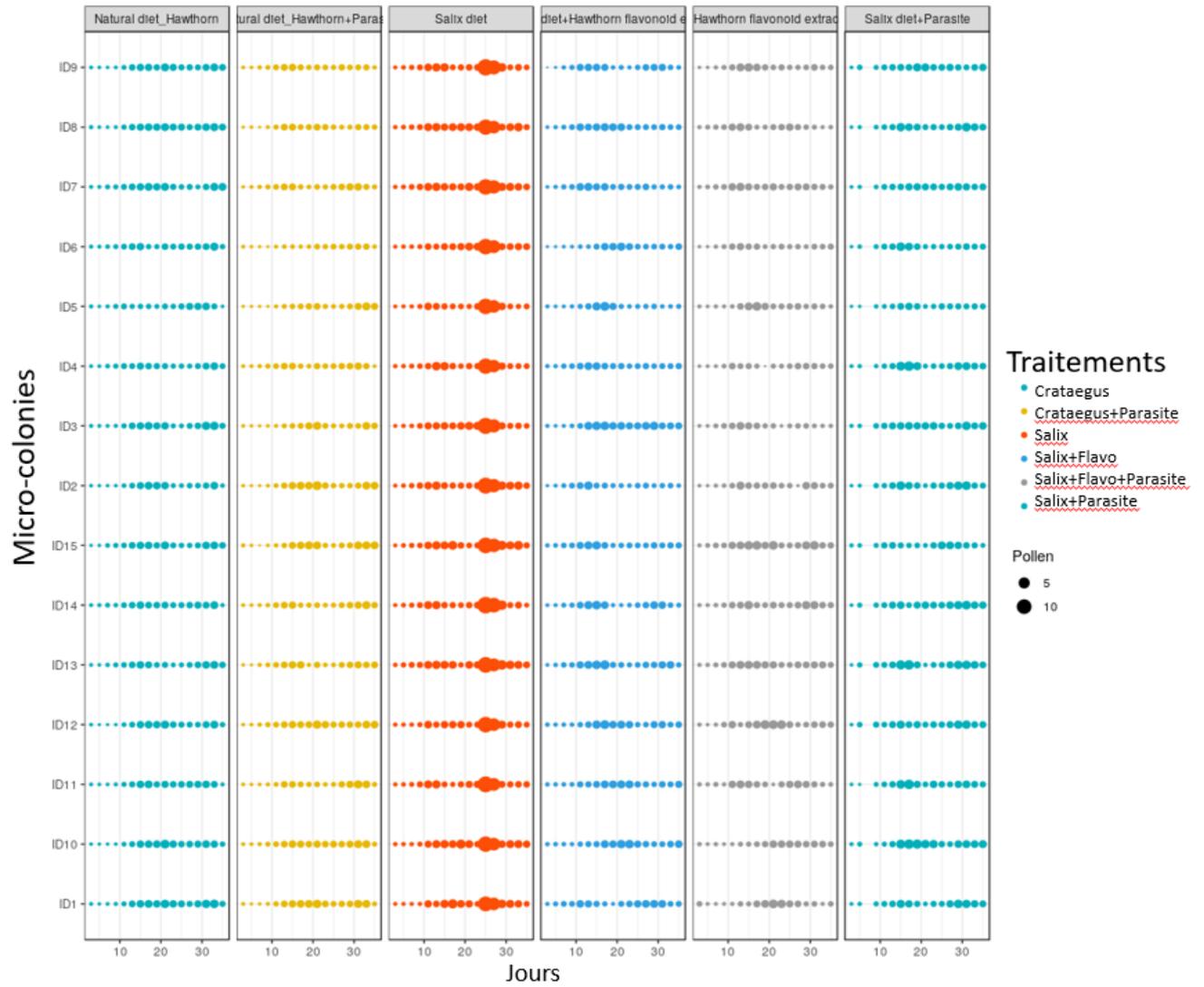


Figure 16 : graphique de la dynamique de consommation du pollen. Chaque point représente la consommation de pollen d'une micro-colonie pour un intervalle de temps. Plus le point est large et plus la consommation est élevée.

Sirop

Les tests de Wald de type II révèlent un effet significatif de la variable parasite ($\chi^2 = 5.502$, $df = 1$, $p = 0,01899$). Les comparaisons multiples indiquent que la masse de sirop standardisée est significativement moins importante chez les colonies parasitées ($p < 0,05$) (Fig. 17).

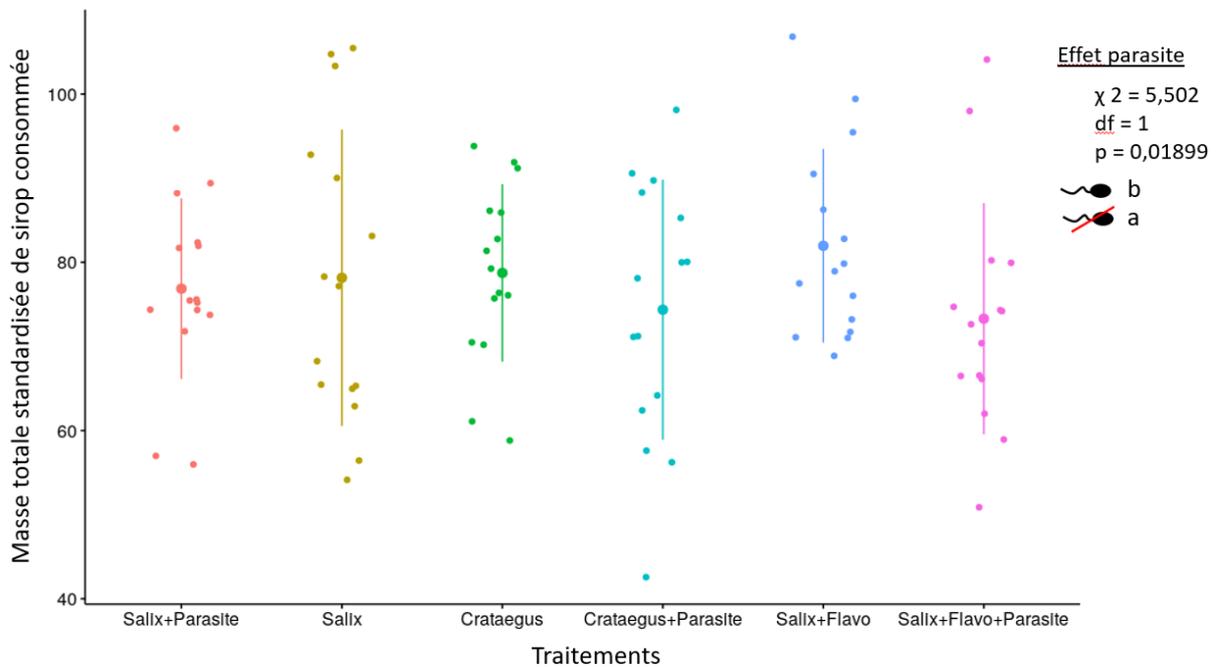


Figure 17 : Graphique de la masse totale standardisée de sirop consommée en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur de chaque micro-colonie, les gros représentent la valeur moyenne en fonction du traitement et les barres correspondent à l'écart-type.. Les lettres correspondent aux différences significatives.

Les analyses montrent un effet significatif du traitement ($F(5 ; 278,08) = 3.2429, p < 0.001$), du temps (jours) ($F(1 ; 1419) = 2228.3681, p < 0.001$), ainsi que du traitement par jour ($F(5 ; 1419) = 4.3585, p < 0.001$) sur la dynamique de consommation de sirop (Fig. 18).

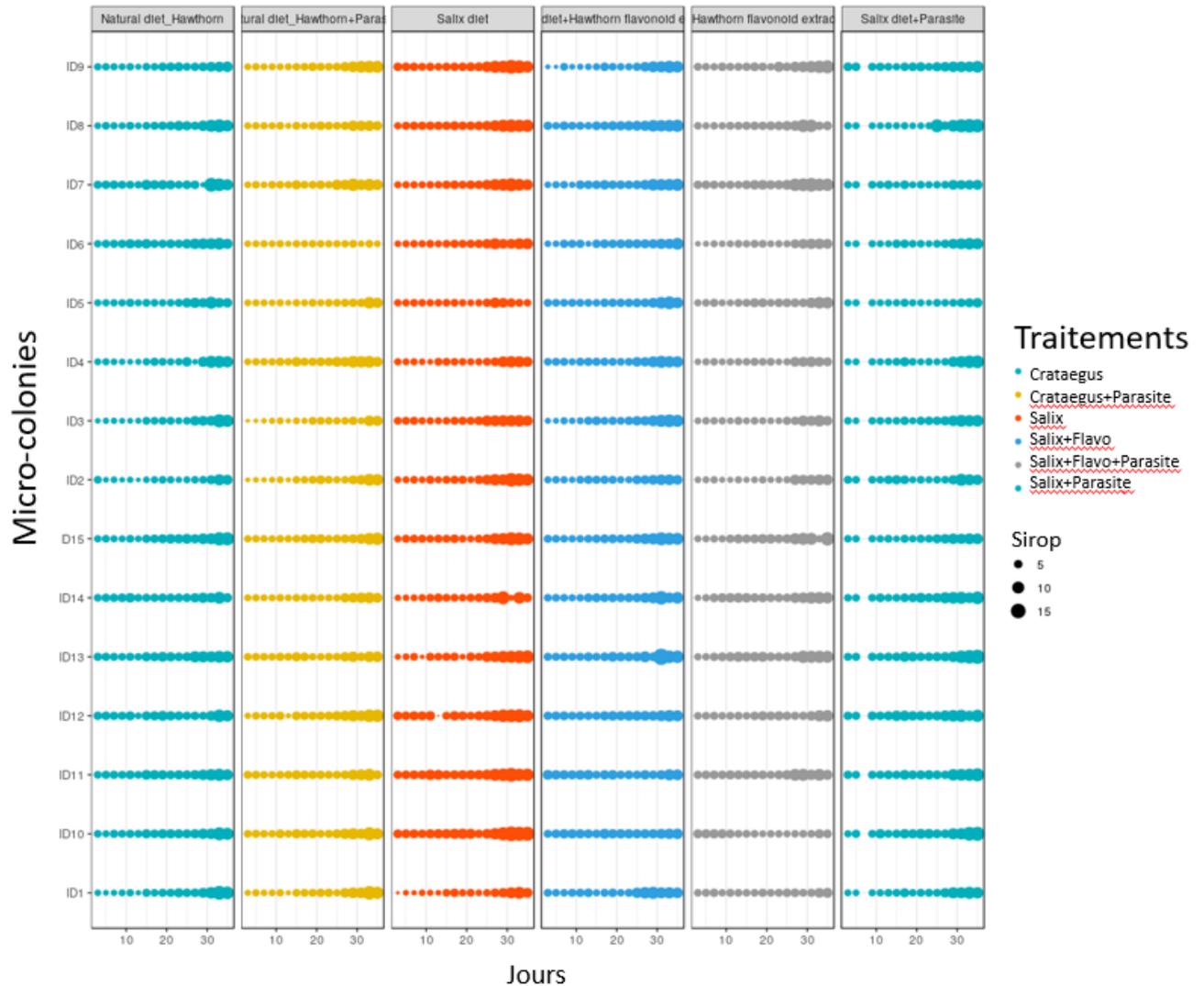


Figure 18 : graphique de la dynamique de consommation du sirop. Chaque point représente la consommation de sirop d'une micro-colonie pour un intervalle de temps. Plus le point est large et plus la consommation est élevée.

5.3 Développement des micro-colonies

5.3.1 Développement du couvain

Les analyses révèlent un effet significatif de la variable « diète » ($\chi^2 = 18.638$, $df = 2$, $p < 0,001$) ainsi que de la variable « parasite » ($\chi^2 = 10.133$, $df = 1$, $p < 0,001456$) sur la masse totale du couvain. Les comparaisons multiples indiquent que de manière générale, les micro-colonies nourries au saule supplémenté en flavonoïdes ont produit une masse de couvain plus faible que celles nourries au saule et au pollen d'aubépine, qui sont similaires entre elles. En ce qui concerne l'effet « parasite », les micro-colonies parasitées ont produit moins de couvain que les non-parasitées, indépendamment de la diète pollinique (Fig. 19).

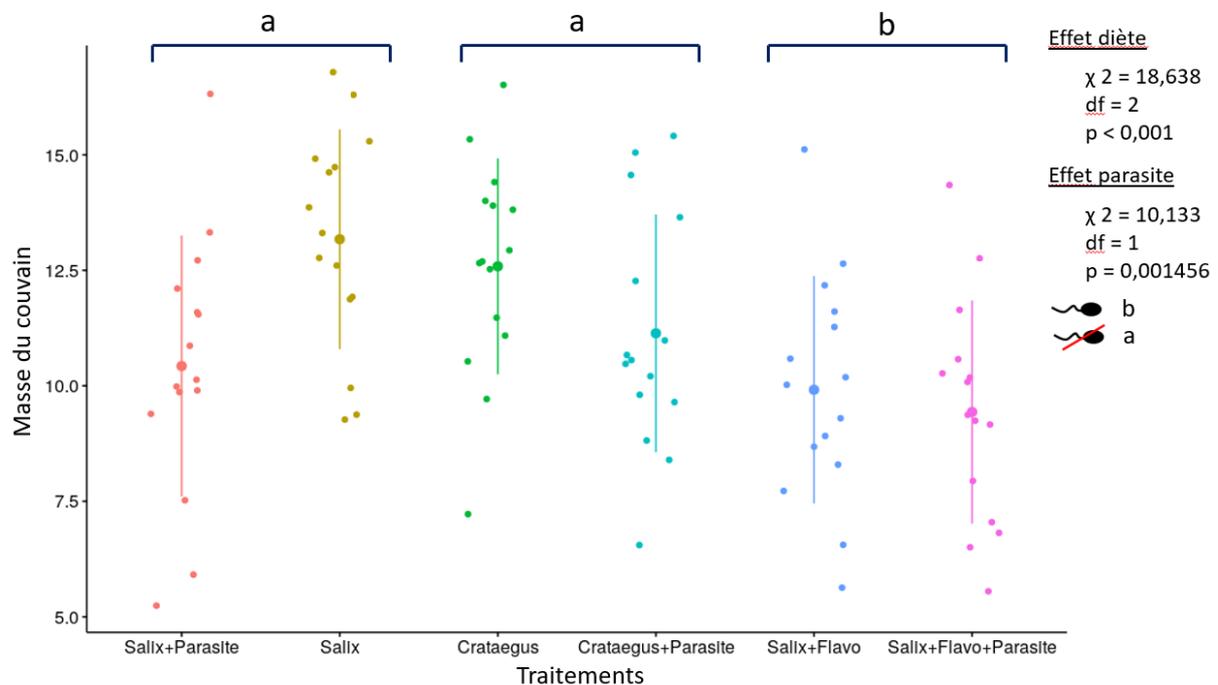


Figure 19 : Graphique de la masse du couvain en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur de chaque micro-colonie, les gros points représentent la valeur moyenne en fonction du traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les accolades définissent les diètes. Les lettres correspondent aux différences significatives.

Si l'on considère l'impact de la diète, de la présence de parasite et leur interaction sur la masse de chacun des stades au sein du couvain pris individuellement, les analyses révèlent qu'aucun effet n'est détecté. Seule la masse totale des mâles émergés semble significativement altérée par la présence de parasites ($\chi^2 = 4.1606$, $df = 1$, $p < 0,04138$), la

masse totale des mâles émergés issus des micro-colonies parasitées étant significativement inférieure à celle issue des micro-colonies saines, indépendamment de la diète (Fig. 20).

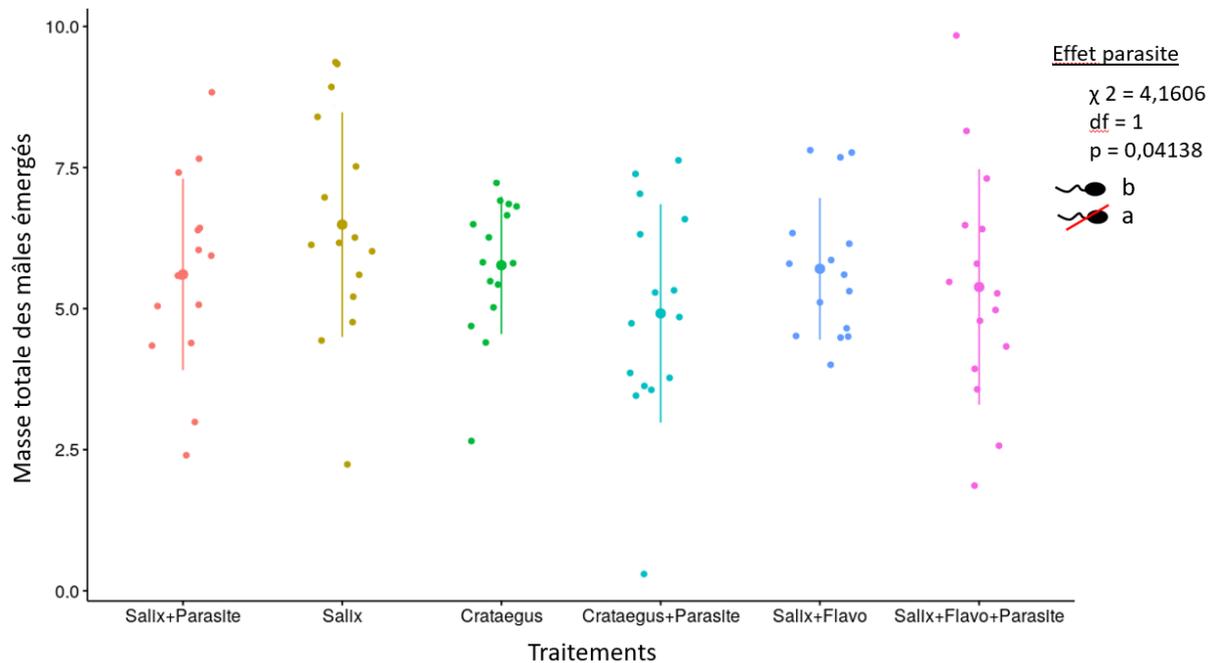


Figure 20 : Graphique de la masse des mâles émergés en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur moyenne de chaque micro-colonie, les gros points représentent la valeur moyenne en fonction du traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives.

Si l'on considère l'impact de la diète, de la présence de parasite et leur interaction sur le nombre d'individus produits pour chacun des stades au sein couvain pris individuellement, les analyses révèlent qu'aucun effet n'est détecté sur (i) le nombre d'œufs, (ii) le nombre de larves isolées post-défécation, (iii) le nombre de pupes, et (iv) le nombre de mâles non émergés. A l'inverse, le nombre de larves non-isolées diffère significativement selon la diète fournie aux micro-colonies ($\chi^2 = 52.239$, $df = 2$, $p < 0,001$), les micro-colonies nourries au saule supplémenté en flavonoïdes ayant un nombre moins élevé de larves non-isolées en fin d'expérimentation comparé à celles nourries au saule et au pollen d'aubépine, qui sont similaires entre elles (Fig. 21).

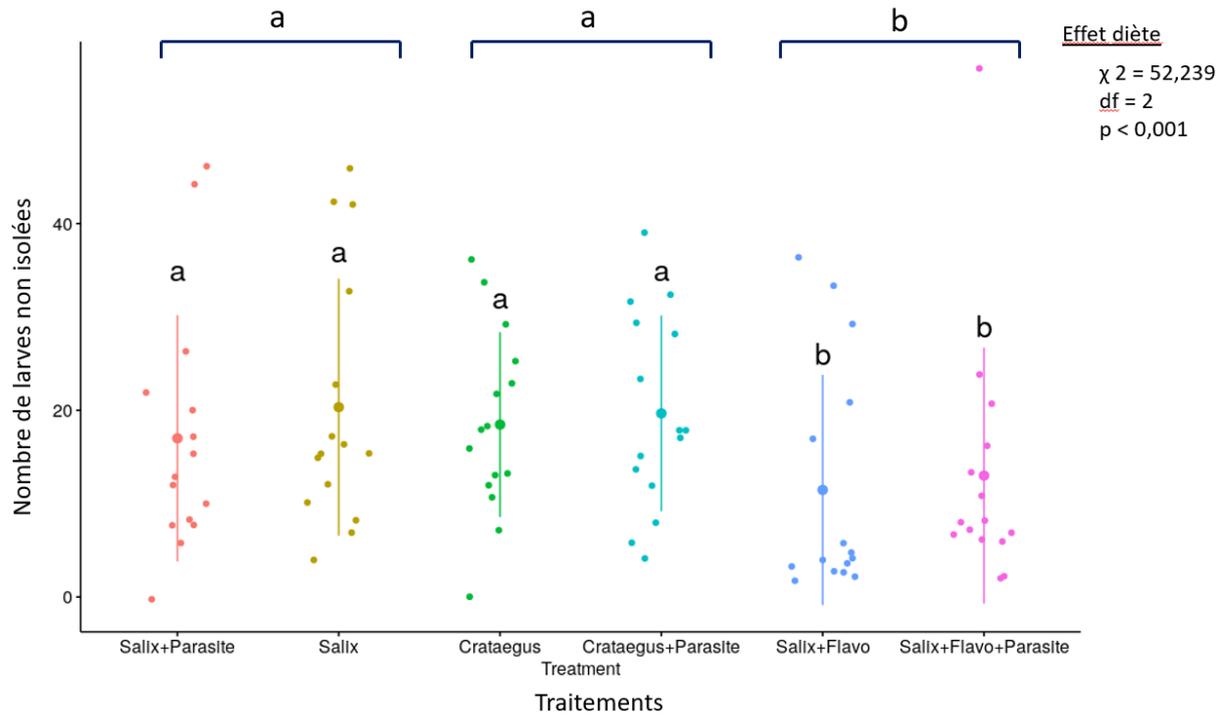


Figure 21 : Graphique du nombre de larves non-isolées en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur de chaque micro-colonie, les gros représentent la valeur moyenne par diète et les barres correspondent à l'écart-type. Les accolades définissent les diètes. Les lettres correspondent aux différences significatives de la variable analysée.

En ce qui concerne le nombre de larves isolées pré-défécation, les analyses indiquent une interaction entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 384555$, $df = 5$, $p < 0,001$). Les comparaisons multiples et la structuration des moyennes indiquent que toutes les diètes diffèrent significativement entre elles, les micro-colonies parasitées et nourries au saule ayant le nombre le moins élevé de larves isolées pré-défécation en fin d'expérimentation et les micro-colonies saines nourries au pollen d'audépine ayant le nombre le plus élevé (Fig. 22).

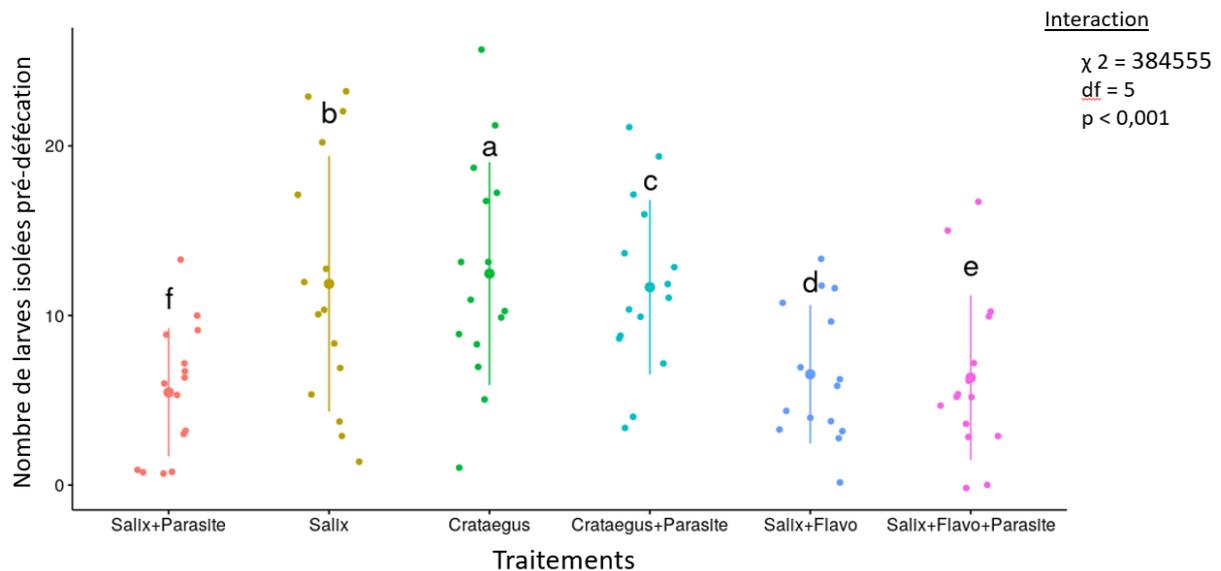


Figure 22 : Graphique du nombre de larves isolées pré-défécation en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur moyenne de chaque micro-colonie, les gros points représentent la valeur moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives de la variable analysée.

Les analyses révèlent également un impact significatif de la présence des parasites sur le nombre de mâles émergés ($\chi^2 = 6,0254$, $df = 1$, $p < 0,0141$), les micro-colonies parasitées présentant un nombre de mâles émergés significativement moins élevé que les micro-colonies saines, indépendamment de la diète (Fig. 23).

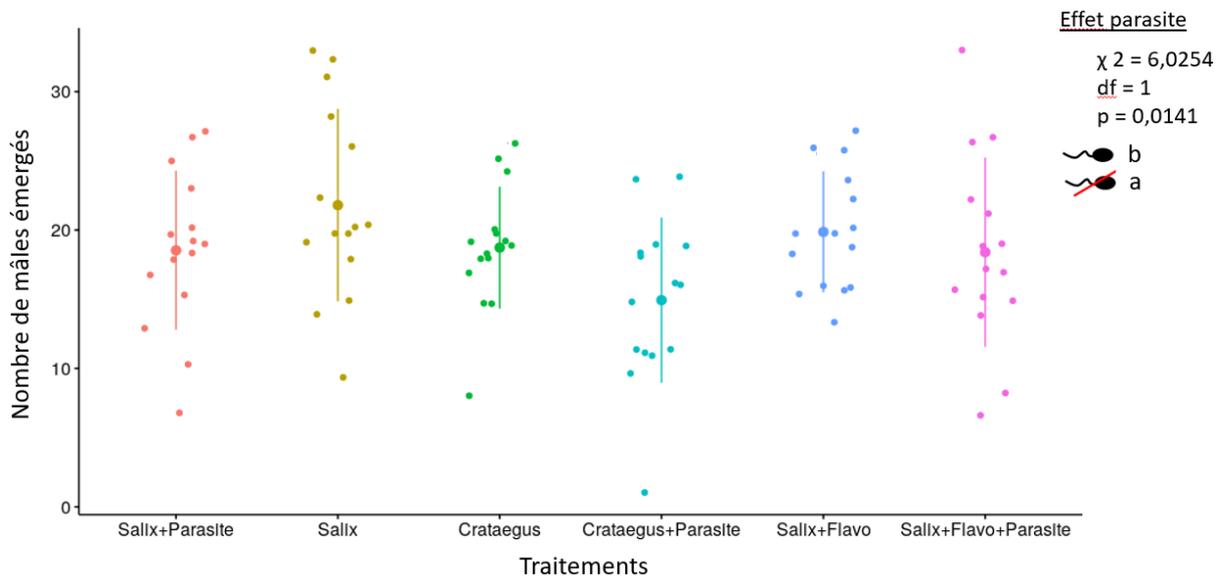


Figure 23 : Graphique du nombre de mâles émergés en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur de chaque micro-colonie, les gros représentent la valeur moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives.

5.3.2 Mortalités

Mortalités des ouvrières

Les mortalités observées au jour 13 au sein d'une micro-colonie saine nourrie au saule étant dues à une erreur humaine (inaccessibilité au sirop), elles n'ont pas été prises en compte pour déterminer les éventuels effets des traitements (Fig. 24).

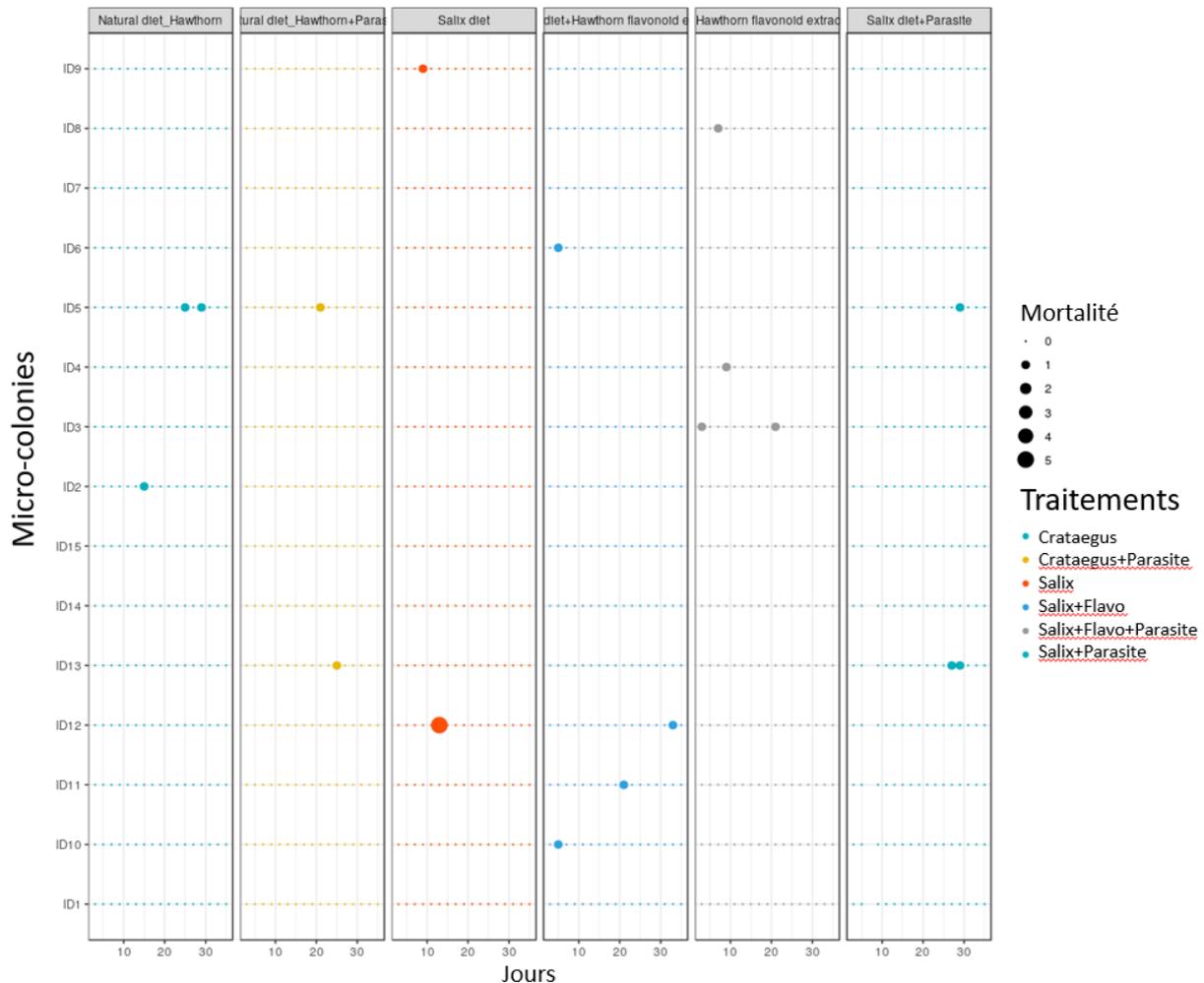


Figure 24 : graphique de la dynamique de mortalité des ouvrières. Chaque point représente la mortalité observée à un intervalle défini. Plus le point est large et plus la mortalité est élevée.

Les analyses ne révèlent aucun effet significatif de la diète, de la présence de parasite ou une interaction entre ces deux variables sur la mortalité des ouvrières observées au cours des essais biologiques (Fig. 25).

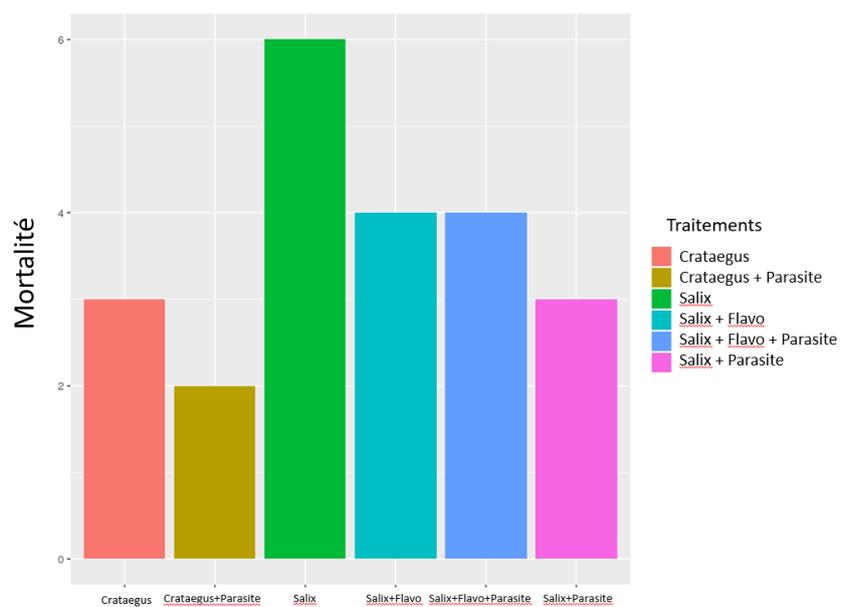


Figure 25 : somme des mortalités en fonction du traitement.

Ejections larvaires

Les analyses révèlent une interaction significative entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 10,2563$, $df = 2$, $p < 0,005928$). Les comparaisons multiples et structurations des moyennes indiquent que les taux d'éjection larvaire sont significativement plus importants dans les micro-colonies nourries au saule supplémenté en flavonoïdes, indépendamment du statut sanitaire des micro-colonies. L'interaction est principalement due au fait que la présence de parasites diminue significativement le taux d'éjections larvaires dans les micro-colonies nourries au saule alors qu'elle n'a aucune influence au sein des colonies nourries avec les autres diètes (Fig. 26).

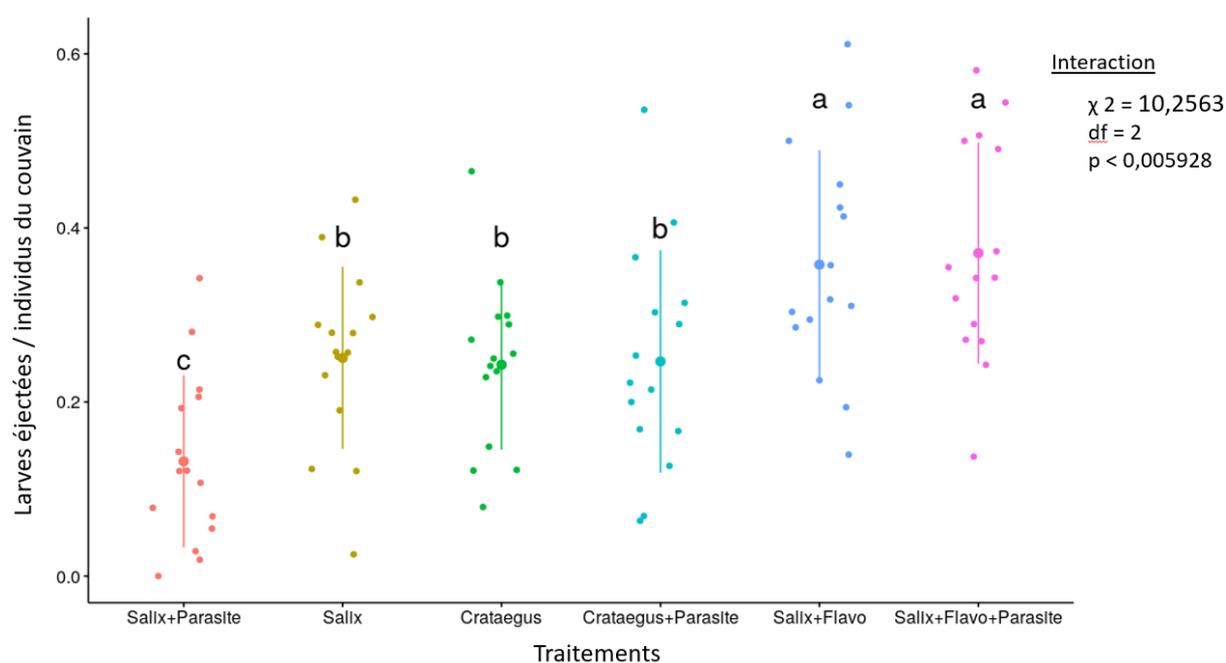


Figure 26 : Graphique des larves éjectées sur l'ensemble des larves du couvain en fonction du traitement. Les petits points représentent la valeur de chaque micro-colonie, les gros représentent la valeur moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitements.

5.3.3 Efficacité pollinique

Les analyses révèlent une interaction significative entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 55,544$, $df = 2$, $p < 0,001$). Les comparaisons multiples et structuration de moyennes indiquent que l'efficacité pollinique est significativement plus élevée dans les micro-colonies nourries au pollen d'aubépine, indépendamment du statut sanitaire des micro-colonies. L'interaction est principalement due au fait que, contre-intuitivement, la présence de parasites augmente significativement l'efficacité pollinique dans les micro-colonies nourries au saule alors qu'elle n'a aucune influence au sein des colonies nourries avec les autres diètes (Fig. 27).

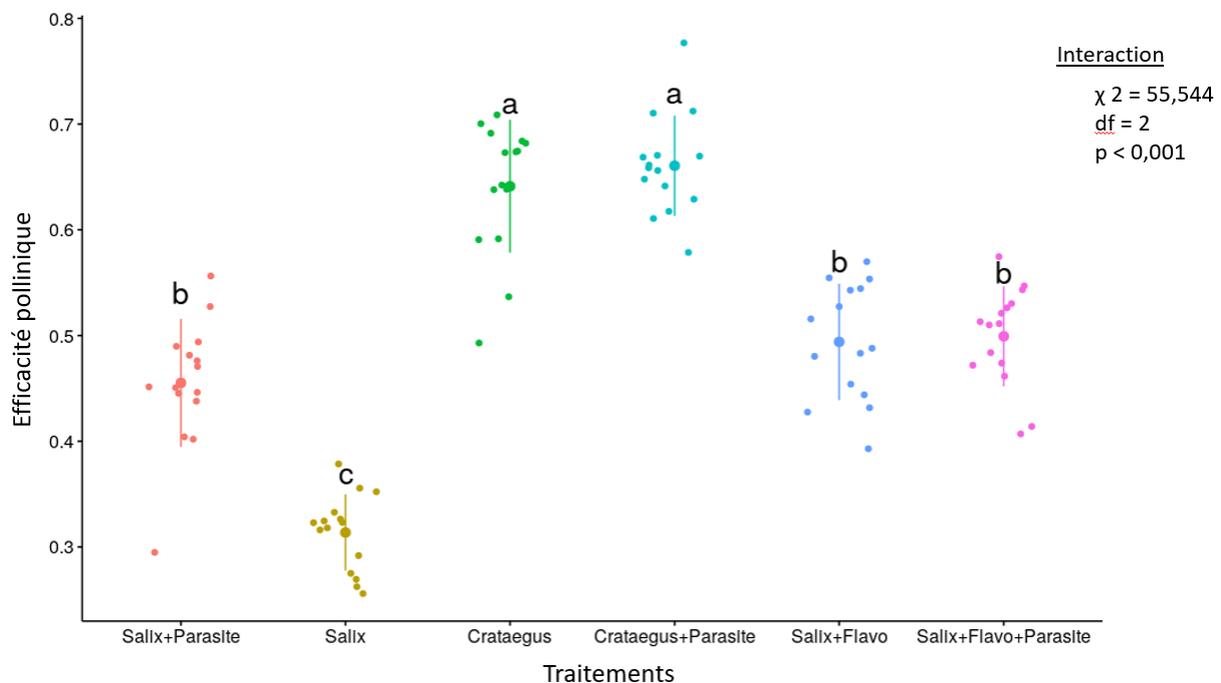


Figure 27 : Graphique de l'efficacité pollinique en fonction du traitement. Les petits points représentent l'efficacité pollinique de chaque micro-colonie, les gros représentent l'efficacité moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitements.

5.3.4 Dilution du pollen

Les analyses révèlent une interaction significative entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 44,102$, $df = 2$, $p < 0,001$). Les comparaisons multiples et structurations de moyennes indiquent que la dilution du pollen est significativement plus élevée dans les micro-colonies nourries au saule, indépendamment du statut sanitaire des micro-colonies. L'interaction est principalement due au fait que la présence de parasites augmente significativement le comportement de dilution du pollen dans les micro-colonies nourries au saule alors qu'elle n'a aucune influence au sein des colonies nourries avec les autres diètes (Fig. 28).

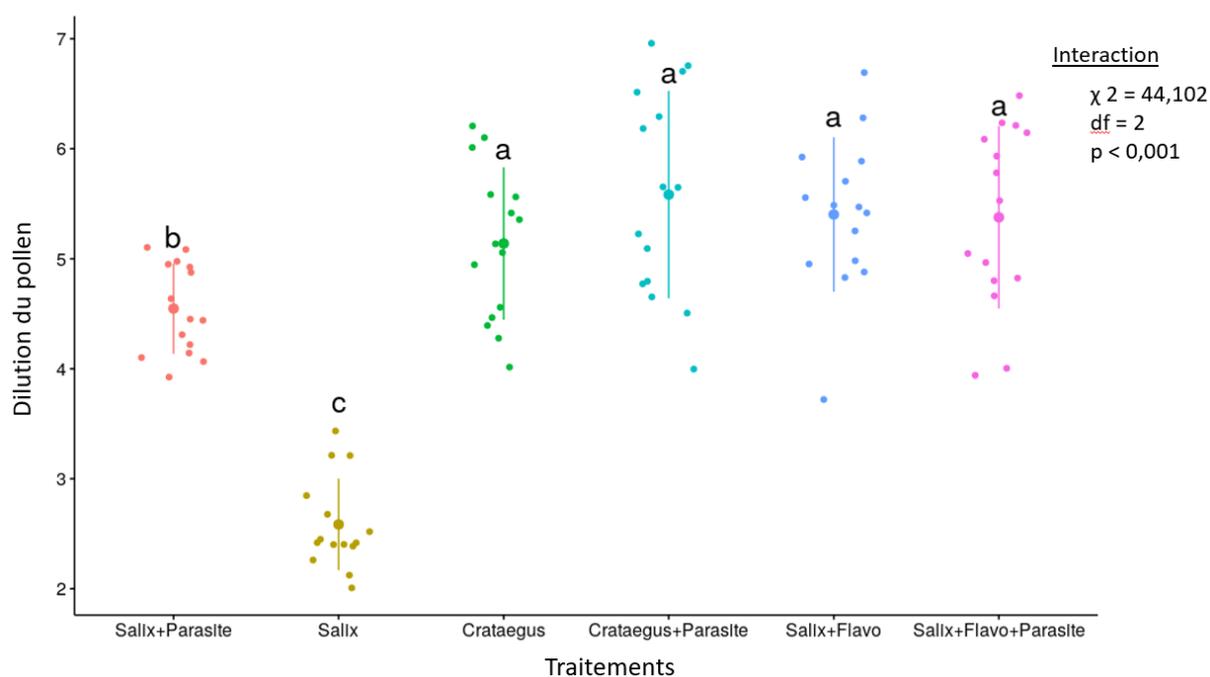


Figure 28 : Graphique de la dilution du pollen en fonction du traitement. Les petits points représentent l'efficacité pollinique de chaque micro-colonie, les gros points représentent l'efficacité moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitements.

5.4 Corps gras

Ouvrières

Les analyses révèlent un effet significatif de la variable « diète » ($\chi^2 = 111,67$, $df = 2$, $p < 0,001$) ainsi que de la variable « parasite » ($\chi^2 = 13,277$, $df = 1$, $p < 0,001$) sur la masse de corps gras des ouvrières. Les comparaisons multiples indiquent que de manière générale, les ouvrières issues des micro-colonies nourries au saule présentent une masse de corps gras significativement plus importante alors que celles issues des micro-colonies nourries au pollen d'aubépine présentent une masse de corps gras significativement moins importante (Fig. 29). En ce qui concerne l'effet « parasite », les ouvrières issues des micro-colonies parasitées ont significativement moins de corps gras que celles issues des micro-colonies saines, indépendamment de la diète pollinique (Fig. 29).

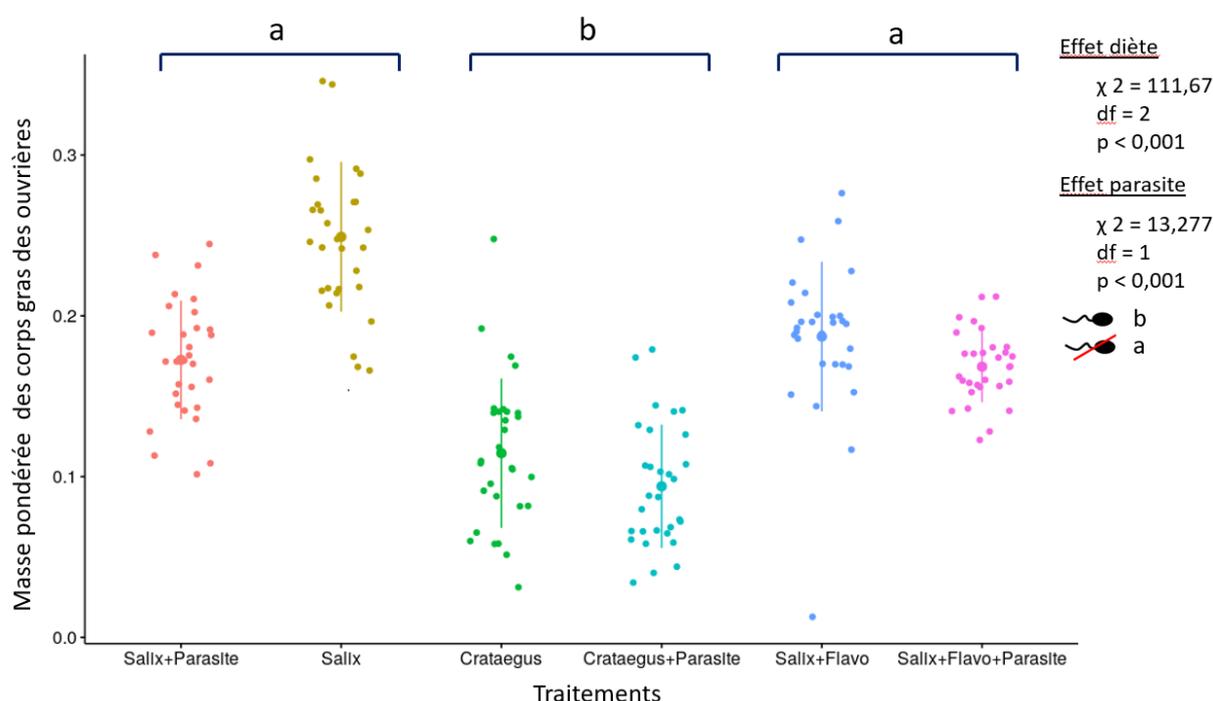


Figure 29 : Graphique de la masse pondérée des corps gras des ouvrières en fonction du traitement.

Les petits points représentent la masse moyenne de corps gras pondérée des ouvrières de chaque micro-colonie, les gros représentent la valeur moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les accolades définissent les diètes. Les lettres correspondent aux différences significatives entre groupes comparés.

Mâles émergés

Les analyses révèlent une interaction significative entre les effets « diète » et « parasite » ($\chi^2 = 17,43$, $df = 2$, $p < 0,001$) sur la masse de corps gras des mâles nouvellement émergés. Les comparaisons multiples et structuration des moyennes indiquent que les mâles issus des micro-colonies saines nourries au saule et au saule supplémenté en flavonoïdes présentent une masse de corps gras significativement plus importante que pour les autres traitements. L'interaction est principalement due au fait que la présence de parasites diminue significativement la masse de corps gras des mâles issus des micro-colonies nourries au saule et au saule supplémenté en flavonoïdes, alors qu'elle n'a aucune influence au sein des colonies nourries avec le pollen d'aubépine (Fig. 30).

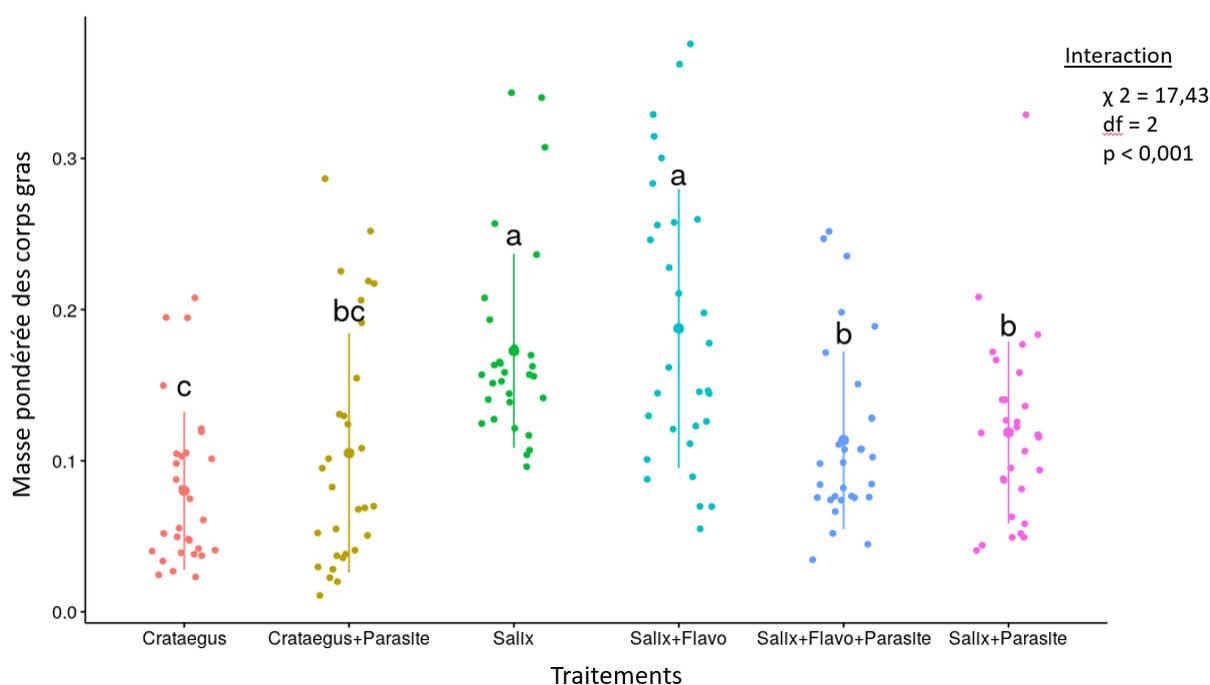


Figure 30 : Graphique de la masse pondérée des corps gras des mâles émergés en fonction du traitement. Les petits points représentent l'efficacité pollinique de chaque micro-colonie, les gros points représentent l'efficacité moyenne par traitement et les barres correspondent à l'écart-type. Les lettres correspondent aux différences significatives entre traitements.

5.5 Charge parasitaire

Les analyses révèlent uniquement un effet significatif du temps ($F_{1,447} = 164.0943$, $p < 0.001$). La charge parasitaire augmente les premiers jours (mise en place de l'infection) puis semble se stabiliser au cours du temps, indépendamment de la diète pollinique fournie aux micro-colonies (Fig. 31).

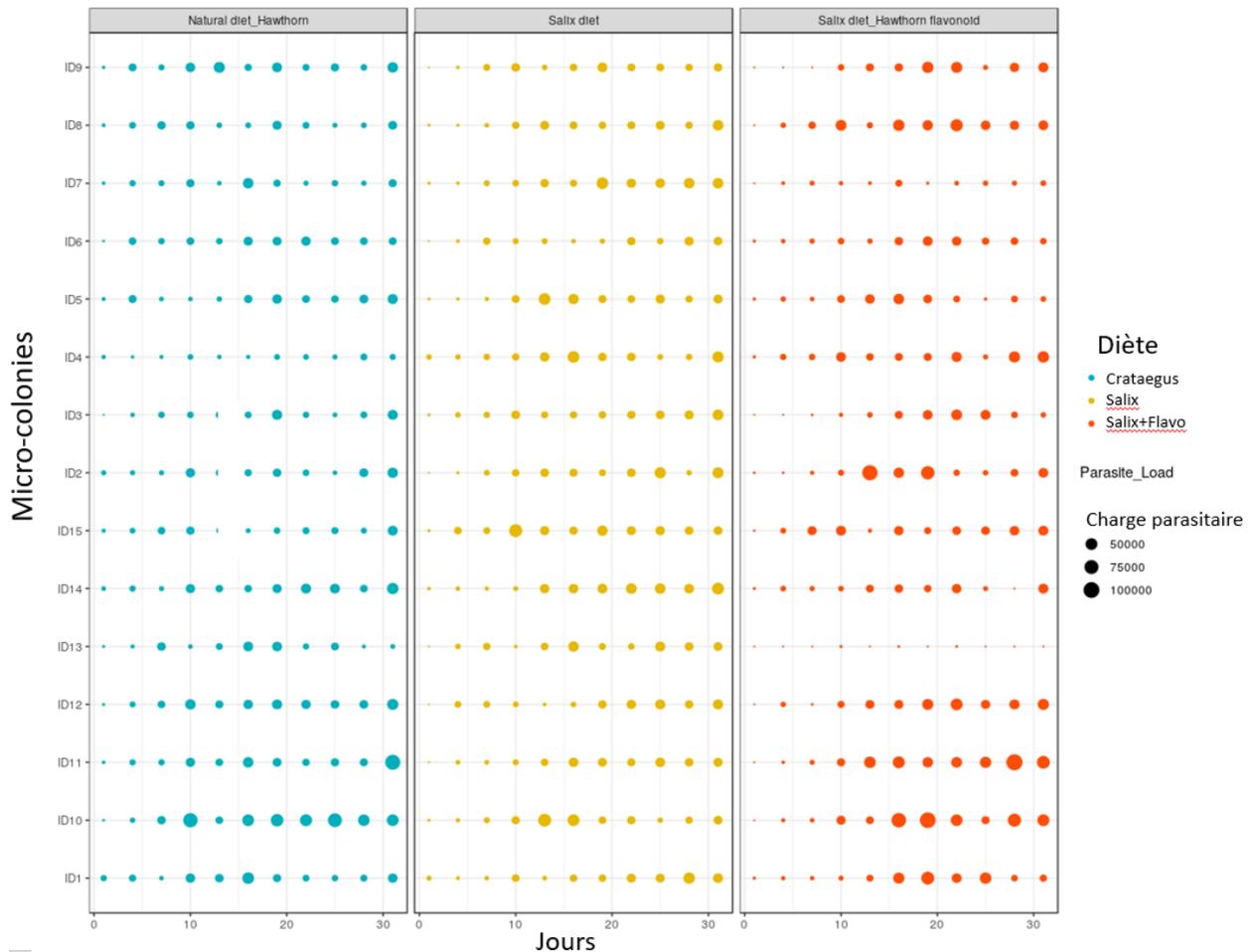


Figure 31 : graphique de la dynamique de la charge parasitaire. Chaque point représente la consommation de sirop d'une micro-colonie pour un instant précis. Plus le point est large et plus la charge parasitaire est élevée.

6. Discussion

6.1 Analyses chimiques

Premièrement, les caractérisations démontrent une composition chimique d'une grande diversité. En effet, les analyses ont identifié pas moins de 17 composés différents chez *C. monogyna*, et ce uniquement dans le groupe des flavonoïdes. Ces résultats appuient les connaissances actuelles de cette plante à fleurs, chez qui de nombreuses molécules bioactives ont été découvertes, notamment des flavonoïdes (Kirakosyan et al., 2003 ; Barros et al., 2011 ; Nabavi et al., 2015). Les différentes parties étudiées sont fortement hétérogènes, tant en termes de composition qu'en termes de concentrations.

Tout d'abord, les concentrations totales en flavonoïdes indiquent clairement une pauvreté du nectar en flavonoïdes, contrairement aux autres parties. Cette substance est relativement simple chimiquement, ce qui peut en partie s'expliquer par le fait qu'il joue l'unique rôle de récompense florale (Brandenburg et al., 2009 ; Heil, 2011). Ces dernières, quant à elles, possèdent des concentrations en flavonoïdes significativement plus importantes. Les feuilles, parties végétatives, possèdent une concentration élevée. Ces résultats, en accord avec la littérature scientifique (Csuma et al., 2011), pourraient s'expliquer en partie par les propriétés défensives des flavonoïdes contre les herbivores ou les fungi (Valkama et al., 2005 ; Xiao et al., 2019). Les concentrations des corolles s'expliqueraient en partie par ce même phénomène de défense, ou encore par la présence de pigments, nécessaires à l'attraction des pollinisateurs (Iwashina, 2003).

Les concentrations en flavonoïdes du pollen sont également en accord avec la littérature scientifique (Palmer-Young et al., 2019). Ces résultats soutiennent le fait que les métabolites spécialisés, dans ce cas les flavonoïdes, joueraient un rôle de médiateur dans les interactions plantes – pollinisateurs (Praz et al., 2008). Le fait que de nombreux composés sont jugés indicateurs selon les analyses IndVal suggèrent que sa composition est hautement spécialisée. Les composés indicateurs les plus fiables sont : la méthoxyquercétine-3-O-dihexoside, la méthoxyquercétine-3-O-hexosylrhamnoside et la méthoxyquercétine-3-O-hexoside. Si ce travail parvient à démontrer une bioactivité significative des flavonoïdes d'aubépine dans le cadre de ces bio-essais, ces trois composés seront les plus susceptibles d'être impliqués.

6.2 Toxicité des composés

Tout d'abord, certains résultats semblent démontrer un effet clair des diètes contenant des flavonoïdes par rapport au contrôle positif. En effet, la dilution pollinique ainsi que la consommation de pollen sont significativement différentes chez les individus ayant subi un traitement contenant des flavonoïdes. D'autre part, de nombreux résultats suggèrent un impact non significatif des diètes. C'est le cas de la consommation de sirop, de la masse totale de chaque stade larvaire, du nombre de larves isolées pré-défécation, du nombre de mâles émergés ainsi que des mortalités observées. Enfin, certaines analyses indiquent des différences significatives entre les deux diètes contenant des flavonoïdes. C'est le cas des masses des couvains, des éjections larvaires, des mesures de corps gras, du nombre de larves non-isolées ainsi que de l'efficacité pollinique.

Concrètement, ces résultats, fortement hétérogènes, ne permettent pas de confirmer l'hypothèse selon laquelle les flavonoïdes contenus dans le pollen d'aubépine auraient un impact sur la « fitness » des individus. Il semble en effet y avoir un impact de la diète sur les performances des micro-colonies ainsi que sur la collecte de ressources. Cette observation est en accord avec la littérature scientifique, qui s'accorde à dire que la qualité des ressources florales influence grandement le comportement et la survie des pollinisateurs (Praz et al., 2008 ; Chapman, 2012). Néanmoins, les résultats des diètes contenant des flavonoïdes (*Crataegus* et *Salix* + Flavo) diffèrent significativement dans de nombreux cas. Or, ces deux diètes sont, selon les calculs et les recettes établies, sensiblement similaires en termes de flavonoïdes. Ces observations suggèrent donc que les effets de la diète impliquent des phénomènes autres que la simple présence de ces composés. Premièrement, la qualité intrinsèque du pollen, en grande partie déterminée par sa concentration en peptides (Nicolson, 2011 ; Vanderplanck et al., 2014b), a sans doute un effet non négligeable sur *B. terrestris* (Génissel et al., 2002). La diversité certaine de composés ainsi que les différences en métabolites spécialisés autres que les flavonoïdes entre le pollen de saule et le pollen de *C. monogyna* pourraient également biaiser les résultats (Palmer-Young et al., 2019 ; Vanderplanck et al., 2014).

6.3 Impact sur *C. bombi*

Les nombreuses études effectuées sur *C. bombi* et plus précisément l'influence qu'il peut avoir sur ses hôtes vont globalement dans un sens : le parasite, s'il n'est pas directement mortel, a un impact considérable sur la « fitness » de l'abeille infectée (Brown et al., 2000 ; Brown et al., 2003 ; Gegeer et al., 2005). Dans le cadre de ce travail, de nombreuses mesures présentent un effet parasite significativement négatif, tant dans la collecte de ressources (dilution pollinique) que dans les performances des micro-colonies (masse du couvain, nombre et masse des mâles émergés). Cet effet est flagrant pour les analyses de corps gras des ouvrières, chez qui ces tissus sont nettement atrophiés chez les individus parasités. Cette différence semblerait due à une activité immunitaire intensifiée, hypothèse appuyée par les recherches de Hoffmann & Richhart (1997) et Choi et al. (2008).

Néanmoins, bien que la présence de parasite ait des effets clairs sur les données analysées, confirmer l'hypothèse selon laquelle les flavonoïdes auraient un effet thérapeutique s'avère délicat. Ces composés sont à l'origine de nombreux phénomènes, notamment anti-pathogènes (Fawe et al., 1998 ; McNally et al., 2003), potentiellement efficaces contre le genre *Crithidia* (Alotaibi et al., 2019). Cependant, malgré la diversité de données analysées, il est impossible de déterminer un quelconque effet thérapeutique des flavonoïdes sur *B. terrestris* quand celui-ci est infecté par *C. bombi*. Par ailleurs, les résultats ne démontrent aucun effet positif du pollen de *C. monogyna* sur les individus infectés. Autrement dit, les résultats suggèrent qu'il n'y aurait aucun composé thérapeutique dans le pollen d'aubépine, en tous cas pour les modèles choisis.

6.4 Limitations

Le pollen massif, utilisé pour les diètes de l'expérimentation, ne provient pas des mêmes individus ni de la même région que celui utilisé pour les analyses fines. Alors que le pollen massif provient du Lot-Et-Garonne, les échantillons utilisés pour les analyses fines proviennent d'individus présents sur le campus de l'UMONS, à Mons, en Belgique. Les facteurs abiotiques tels que le climat, le type de sol ou l'altitude différent, engendrant potentiellement des différences de composition chimique (Nilsen & Orcutt, 1996 ; Berini et al., 2018). Il se pourrait également que des sous-espèces différentes aient été récoltées, provoquant de potentiels biais.

Le stress provoqué par les manipulations de mesure de charge parasitaire consistant à isoler les ouvrières concernées le temps de récolter leurs fèces a potentiellement biaisé certaines mesures. Une solution pourrait être de manipuler de la même façon l'ensemble des individus impliqués dans les bio-essais.

7. Conclusion

Les bio-essais en laboratoire, à l'instar de toutes expérimentations tentant de reproduire et comprendre le monde du vivant, sont des opérations fastidieuses et inexactes. L'étendue des facteurs biotiques et abiotiques est telle qu'il est impossible d'être tout à fait fidèle aux conditions naturelles. Ce travail a permis de mettre en lumière la diversité chimique du modèle *C. monogyna*, dans sa globalité mais aussi les différences non négligeables entre les différentes parties étudiées. Les résultats illustrent clairement l'impact négatif de *C. bombi* sur *B. terrestris*. Il semblerait également que *B. terrestris* soit moins adapté à la diète à base de pollen d'aubépine ainsi qu'à celle supplémentée en flavonoïdes. Cependant, les résultats sont hétérogènes et ne permettent pas de tirer de conclusions sur la toxicité des composés ciblés uniquement, ni sur leur potentiel médicatif.

8. Perspectives

Il se pourrait qu'un effet de dose soit impliqué dans le phénomène. Autrement dit, les doses testées étaient peut-être inappropriées, rendant impossible des observations satisfaisantes. De la même manière, les modèles choisis (*B. terrestris* et *C. bombi*) pourraient avoir empêché l'obtention de résultats, bien qu'à première vue cette association pollinisateur – parasite semble fiable. Les limitations évoquées au chapitre 6.4 pourraient également être supprimées en perfectionnant les manipulations.

Malgré les résultats peu satisfaisants de ce travail, il serait intéressant de réitérer de telles expérimentations sur d'autres modèles de plantes à fleurs. D'autre part, il pourrait être possible de cibler d'autres groupes de composés sur ce même modèle, l'aubépine présentant une grande diversité de métabolites spécialisés. Bien qu'aucun effet significatif du pollen d'aubépine n'ait été déterminé dans le cadre de ce travail, de prochaines études pourraient obtenir des résultats opposés et prometteurs. Enfin, *C. monogyna* étant une espèce courante, appréciée des pollinisateurs et abondamment présente dans les espaces verts pour les haies, elle est une espèce qui serait un parfait candidat pour le projet ARC si des résultats intéressants étaient obtenus.

9. Références

- Rasmont, P., Pauly, A., Terzo, M., Patiny, S., Michez, D., Iserbyt, S., Barbier, Y., Haubruge, E.** (2005). The survey of wild bees (Hymenoptera, Apoidea) in Belgium and France, Rapport d'activité, UMH - FUSAGx - FAO, 18pp),
- Jansen MAK, Van den Noort RE, Tan MY. et al.** Phenol-oxidizing peroxidases contribute to the protection of plants from ultraviolet radiation stress. *Plant Physiol.* 2001; 126:1012-1023. 28
- Aeschimann, D., Lauber, K., Moser, D. M., & Theurillat, J.-P.** (2004). *Flora alpina* (Vol. 1). Haupt.
- Alotaibi, A., Ebiloma, G. U., Williams, R., Alenezi, S., Donachie, A. M., Guillaume, S., ... & Watson, D. G.** (2019). European propolis is highly active against trypanosomatids including *Crithidia fasciculata*. *Scientific reports*, 9(1), 1-10.
- Arbetman, M.P., Meeus, I., Morales, C.L., Aizen, M.A., Smagghe, G.** (2013). Alien parasite hitchhikes to Patagonia on invasive bumblebee. *Biological invasions*, 15(3): 489-494.
- Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F. and Aruoma, O.I.** (2003), Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung*, 47: 191-198. <https://doi.org/10.1002/food.200390045>
- Bahri-Sahloul, R., Fredj, R. B., Boughalleb, N., Shriaa, J., Saguem, S., Hilbert, J. L., ... & Harzallah-Skhiri, F.** (2014). Phenolic Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. Ovaries Calli. *Journal of Botany*.
- Barros, L., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C.** (2011). Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochemical analysis*, 22(2), 181-188.
- Berini, J. L., Brockman, S. A., Hegeman, A. D., Reich, P. B., Muthukrishnan, R., Montgomery, R. A., & Forester, J. D.** (2018). Combinations of abiotic factors differentially alter production of plant secondary metabolites in five woody plant species in the boreal-temperate transition zone. *Frontiers in plant science*, 9, 1257.
- Bernatonienė, J.; Masteikova, R.; Majienė, D.; Savickas, A.; Kėvelaitis, E.; Bernatonienė, R.; Dvoráčková, K.; Civinskienė, G.; Lekas, R.; Vitkevičius, K.; Pečiūra, R.** Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. *Medicina* 2008, 44, 706. <https://doi.org/10.3390/medicina44090091>
- Biesmeijer J.C., Roberts S.P., Reemer M., Ohlemueller R., Edwards M., Peeters T., Schaffers A., 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 ;

Blacquiere, T., Smagghe, G., Van Gestel, C.A., Mommaerts, V. (2012). Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4): 973- 992.

Boumendjel A, Pietro AD, Dumontet C, Barron D (2002). Recent Advances in the Discovery of Flavonoids and Analogs with High-Affinity Binding to P-Glycoprotein Responsible for Cancer Cell Multidrug Resistance. *Med. Res. Rev.*: 22: 512-529

Brandenburg, A., Dell’Olivo, A., Bshary, R., & Kuhlemeier, C. (2009). The sweetest thing: advances in nectar research. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 486-490.

Browicz, K. (1972). *Crataegus* L. In P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 4, pp. 133–147). Edinburgh University Press.

Brown, M. J. F., R. Loosli, and P. Schmid-Hempel. (2000). Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos* 91:421–427.

Brown, M. J. F., R. Schmid-Hempel, and P. Schmid-Hempel (2003). Strong context-dependent virulence in a host-parasite system: reconciling genetic evidence with theory. *J. Anim. Ecol.* 72:994–1002.

Buchmann, S. L. (1983). Buzz pollination in angiosperms. *Buzz pollination in angiosperms.*, 73-113.

Buchmann, S. L., & Nabhan, G. P. (1996). The pollination crisis: the plight of the honey bee and the decline of other pollinators imperils future harvests. *The Sciences*, 36(4), 22-28.

Cameron, S.A., Lozier J.D., Strange J.P., Koch J.B., Cordes N., Solter L.F., Griswold, T.L. (2011). Patterns of widespread decline in North American bumble bees. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 108: 662-667

Campos, M. G., Bogdanov, S., de Almeida-Muradian, L. B., Szczesna, T., Mancebo, Y., Frigerio, C., & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 47(2), 154-161.

Cane, J. H., & Payne, J. A. (1988). Foraging ecology of the bee *Habropoda laboriosa* (Hymenoptera: Anthophoridae), an oligolectic of blueberries (Ericaceae: *Vaccinium*) in the southeastern United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 81(3), 419-427.

Cane, J. H., & Sipes, S. (2006). Characterizing floral specialization by bees: analytical methods and a revised lexicon for oligolecty. *Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, 99, 122.

- Choi Y. S., Choo Y. M., Lee K. S., Yoon H. J., Kim I., Je Y. H., Sohn H. D., Jin B. R.** (2008) - Cloning and expression profiling of four antibacterial peptide genes from the bumblebee *Bombus ignites*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 150: 141-146.
- Christensen, K. I.** (1992a). Revision of *Crataegus* Sect. *Crataegus* and *Nothosect. Crataeguineae* (Rosaceae-Maloideae) in the old world. *Systematic Botany Monographs*, 35, 1– 199. <https://doi.org/10.2307/25027810>
- Clark, A. J., & Bloch, K.** (1959). The absence of sterol synthesis in insects. *Journal of Biological Chemistry*, 234(10), 2578-2582.
- Coimbra, A.T., Luís, Â.F.S., Batista, M.T. et al** (2020). Phytochemical Characterization, Bioactivities Evaluation and Synergistic Effect of *Arbutus unedo* and *Crataegus monogyna* Extracts with Amphotericin B. *Curr Microbiol* 77, 2143–2154. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02125-w>
- Costanza R., d'Arge R., de Groot R., Farber S., Grasso M., Hannon B., Limburg K., Naeem S., O'Neill R.V., Paruelo J., Raskin R.G., Sutton P., van den Belt M.** (1997) The value of the World's ecosystem services and natural capital, *Nature* 387, 253– 259.
- Csuma, A., Țuluca, E., Mencinicopski, C., & Biriş-Iovu, A.** (2011). Sources of bioprotective compounds in forest areas. Flavonoids content. *Agro Buletin AGIR*, 3(4), 79-87.
- Danforth BN, Sipes SD, Fang J & Brady SG** (2006b). The history of early bee diversification based on five genes plus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 15118-15123.
- Danijela A Kostić, Jasmina M Velicković*, Snezana S Mitić, Milan N Mitić and Sasa S Randelović** - Phenolic Content, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Crataegus Oxyacantha* L (Rosaceae) Fruit Extract from Southeast Serbia. Department of Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Niš, Visegradska 33, 18000 Nis, Serbia.
- De Bodt, S., Maere, S., & Van de Peer, Y.** (2005). Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in ecology & evolution*, 20(11), 591-597.
- De Groot, A.P.** (1953). Protein and Amino Acid Requirements of the Honey bee (*Apis mellifera*). *Physiologia Comparata et d'Ecologia*, 3: 197-285.
- De Jong, T. J., Waser, N. M., Price, M. V., & Ring, R. M.** (1992). Plant size, geitonogamy and seed set in *Ipomopsis aggregata*. *Oecologia*, 89(3), 310-315.
- Drews, G. N., & Yadegari, R.** (2002). Development and function of the angiosperm female gametophyte. *Annual Review of Genetics*, 36(1), 99-124.
- Duke SO** (2007). The emergence of grass root chemical ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 104(43): 16729-16730

- Ehlers, M.** (1960). Baum und Strauch in der Gestaltung der deutschen Landschaft. Paul Parey.
- Eickwort, G. C., & Ginsberg, H. S.** (1980). Foraging and mating behavior in Apoidea. Annual review of entomology, 25(1), 421-446.
- Ellers, J.** (1996). Fat and eggs: an alternative method to measure the trade-off between survival and reproduction in insect parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, 46, 227-235.
- Erbar, C., & Leins, P.** (1995). Portioned pollen release and the syndromes of secondary pollen presentation in the Campanulales-Asterales-complex. *Flora*, 190(4), 323-338.
- Faegri, K., & Van der Pijl, L.** (1979). A short history of the study of pollination ecology. The Principles of pollination ecology, 1-77.
- Fawe A, Abou-Zaid M, Menzies JG, Belanger RR** (1998). Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology* ; 88(5):396-401. 25.
- Fichtner, A, Wissemann, V** (2021). Biological Flora of the British Isles: *Crataegus monogyna*. *J Ecol.* 2021; 109: 541– 571. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13554>
- Free JB and Butler CG.** Bumblebees. Collins, London, 1959, 221.
- Friis, E. M., Chaloner, W. G., & Crane, P. R.** (1987). The origins of angiosperms and their biological consequences. CUP Archive.
- Gegear, R. J., M. C. Otterstatter, and J. D. Thomson.** (2005). Does parasitic infection impair the ability of bumblebees to learn flower-handling techniques? *Anim. Behav.* 70:209–215.
- Génissel, A., Aupinel, P., Bressac, C., Tasei, J. N., & Chevrier, C.** (2002). Influence of pollen origin on performance of *Bombus terrestris* micro-colonies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 104(2-3), 329-336.
- Gérard M., Michez D., Debat V., Fullgrave L., Meeus I., Piot N., Sculfort O., Vastrade M., Smagghe G., and Vanderplanck M.** (Submitted). Stressful conditions reveal decrease in size, modification of shape but relatively stable asymmetry in bumblebee wings. *Scientific Reports*.
- Ghisbain, G., Gérard, M., Wood, T. J., Hines, H. M., & Michez, D.** (2021). Expanding insect pollinators in the Anthropocene. *Biological Reviews*.
- Gibson, W., & Stevens, J.** (1999). Genetic exchange in the trypanosomatidae. *Advances in parasitology*, 43, 1-46.
- GORBUNOV P. S.,** (1987) - Endoparasitic Flagellates of the genus *Crithidia* (Trypanosomatidae, Zoomastigophorea) from alimentary canal of bumblebees. - *Zool. Zhurnal*, 66

- Gould KS, Lister C** (2006). Flavonoid Functions in plants. In Andersen ØM, Markham KR. (eds.), Flavonoids. CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 397-442
- Goulson, D.** (2003). Bumblebees: their behaviour and ecology. Oxford University Press, USA.
- Goulson, D.** (2006). The demise of the bumblebee in Britain. *Biologist*, 53: 294-299.
- Goulson, D., Lye, G.C., Darvil, B.** (2008). Decline and conservation of bumble bees. *Annual Review of Entomology*, 53: 191-208.
- Grimaldi, D.** (1999). The co-radiations of pollinating insects and angiosperms in the Cretaceous. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 373-406.
- Grixti, J.C., Wong L.T., Cameron, S.A., Favret, C.** (2009). Decline of bumble bees (*Bombus*) in the North American Midwest. *Biological Conservation*, 142: 75-84.
- Guirguis, G. N., & Brindley, W. A.** (1974). Insecticide susceptibility and response to selected pollens of larval alfalfa leafcutting bees, *Megachile pacifica* (Panzer)(Hymenoptera: Megachilidae). *Environmental Entomology*, 3(4), 691-694.
- Gyan, K. Y., & Woodell, S. R. J.** (1987a). Flowering phenology, flower colour and mode of reproduction of *Prunus spinosa* L. (blackthorn); *Crataegus monogyna* Jacq. (hawthorn); *Rosa canina* L (dog rose); and *Rubus fruticosus* L. (bramble) in Oxfordshire, England. *Functional Ecology*, 1(3), 261–268.
- Harder, L. D., & Barclay, R. M. R.** (1994). The functional significance of poricidal anthers and buzz pollination: controlled pollen removal from *Dodecatheon*. *Functional Ecology*, 509-517.
- Hegi, G.** (1923). HEGI: Illustrierte Flora von Mitteleuropa (Vol. 4/2). J. F. Lehmanns.
- Heil, M.** (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200.
- Heinrich, B.** (1979a). Bumblebee Economics. Cambridge, MA: Harvard University Press. 245pp.
- Hernandez I, Alegre L, Munne-Bosch S** (2004). Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. *Tree Physiol.* 2004; 24:1303- 1311.
- Hess, H. E., Landolt, E., & Hirzel, R.** (1977). Flora der Schweiz und angrenzender Gebiete (Vol. 2, 2. Aufl.). Birkhäuser.
- Hoffmann J. A., R ichhart J. M.** (1997) - *Drosophila* immunity. *Trends in Cell Biology*, 7: 309-316.
- Inoue M.N., Yokoyama J., Washitani I.** (2008) Displacement of Japanese native bumblebees by the recently introduced *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera: Apidae), *J. Insect Conserv.* 12, 135–146.

- Iwashina T.** Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biol. Sci. Space*. 2003;17(1): 24-44
- Kaplan E, Kopka J, Haskell DW. et al** (2004). Exploring the Temperature-Stress Metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol.* ; 136: 4159-4168
- Keser S., Celik S., Turkoglu S., Yilmaz O., Turkoglu I** (2014). The Investigation of Some Bioactive Compounds and Antioxidant Properties of Hawthorn (*Crataegus monogyna* subsp. *monogyna* jacq.) *J. Intercult. Ethnopharmacol.* ;3:51–55. doi: 10.5455/jice.20140120103320.
- Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P. B., Warber, S., Bolling, S., & Chang, S. C.** (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(14), 3973-3976.
- Kleijn D, Raemakers I** (2008) A retrospective analysis of pollen host plant use by stable and declining bumble bee species. *Ecology* 89: 1811–1823.
- Klein A.-M., Vaissière B., Cane J.H., Steffan-Dewenter I., Cunningham S.A., Kremer C., Tscharntke T.** (2007) Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proc. R. Soc. London B* 274, 303–313.),
- Kohli RK, Singh HP, Batish DR.** (2001), Allelopathy in Agroecosystems. Published by Food Products Press. Binghamton, USA, pp. 197-218
- Kremen, C., Tscharntke, T.** (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 274: 303-313.
- Lanot A, Morris P** (2005). Elicitation of isoflavan phytoalexins. In Marquez AJ (ed.), *Lotus japonicus handbook*. Springer, The Netherlands, pp. 355-361. 34
- Laverty, T. M., & Plowright, R. C.** (1988). Flower handling by bumblebees: a comparison of specialists and generalists. *Animal Behaviour*, 36(3), 733-740.
- Leonhardt SD, Blüthgen N** (2012) The same, but different: pollen foraging in honeybee and bumblebee colonies. *Apidologie* 43: 449–464.
- Levin, M. D., & Haydak, M. H.** (1957). Comparative value of different pollens in the nutrition of *Osmia lignaria*. *Bee World*, 38(9), 221-226.
- Linsley, E. (1958). The ecology of solitary bees. *Hilgardia*, 27(19), 543-599.
- LIPA J.J. & TRIGGIANI O.**, 1980 - *Crithidia bombi* n. sp., a flagellated parasite of a Bumblebee, *Bombus terrestris*
- Mamolos, A. P., & Kalburtji, K. L.** (2001). Significance of allelopathy in crop rotation. *Journal of crop production*, 4(2), 197-218.
- Manel Belkhir, Olfa Rebai, Karima Dhaouadi, Besma Sioud, Mohamed Amri & Sami Fattouch** (2013) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tunisian Azarole (*Crataegus*

Azarolus L.) Leaves and Fruit Pulp/Peel Polyphenolic Extracts, International Journal of Food Properties, 16:6, 1380-1393, DOI: 10.1080/10942912.2011.586080

McNally DJ, Wurms KV, Labbe C, Belanger RR (2003). Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiol. Mol. plant path.*2003; 63(6):293-303

Meusel, H., Jäger, E. J., Weinert, E., & Bräutigam, S. (Eds.). (1965). *Vergleichende Chorologie der zentraleuropäischen Flora* (Vol. 1). Gustav Fischer

Michalak A (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish J. of Environ. Stud.* ; 15(4): 523-530

Michener, C. D. (1979). Biogeography of the bees. *Annals of the Missouri botanical Garden*, 277-347.

Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press.

Michez, D. (2007). La nouvelle classification des abeilles (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes) ou la chute de l'abeille mellifère (*Apis mellifera* L.) de son piédestal. 2. Brèves.

Michez, D., Vanderplanck, M., & Engel, M. S. (2012). Fossil bees and their plant associates. *Evolution of plant-pollinator relationships*, 103-164.

Middleton EJ (1998). Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1998; 439:175–182. 2.

Mossberg, B., & Stenberg, L. (2010). *Den nya nordiska floran*. Bonnier Fakta.

Müller, A., Diener, S., Schnyder, S., Stutz, K., Sedivy, C., & Dorn, S. (2006). Quantitative pollen requirements of solitary bees: implications for bee conservation and the evolution of bee–flower relationships. *Biological conservation*, 130(4), 604-615.

Nabavi, S. F., Habtemariam, S., Ahmed, T., Sureda, A., Daglia, M., Sobarzo-Sánchez, E., & Nabavi, S. M. (2015). Polyphenolic composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: from chemistry to medical applications. *Nutrients*, 7(9), 7708-7728.

Nabavi, S.F.; Habtemariam, S.; Ahmed, T.; Sureda, A.; Daglia, M.; Sobarzo-Sánchez, E.; Nabavi, S.M (2015). Polyphenolic Composition of *Crataegus monogyna* Jacq.: From Chemistry to Medical Applications. *Nutrients*, 7, 7708-7728. <https://doi.org/10.3390/nu7095361>

Nayak, R. K., Rana, K., Bairwa, V. K., Singh, P., & Bharti, V. D. (2020). A review on role of bumblebee pollination in fruits and vegetables. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(3), 1328-1334.

Nicolson, S. W. (2011). Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of the two. *African Zoology*, 46(2), 197-204.

Nieto, A., Roberts, S. P. M., Kemp, J., Rasmont, P., Kuhlmann, M., García Criado, M., ... & Michez, D. (2014). European Red List of bees. Publication Office of the European Union, Luxembourg. Europe, 2(4).

Nilsen, E. T., & Orcutt, D. M. (1996). Physiology of plants under stress. Abiotic factors. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors.*

Palmer-Young, E. C., Farrell, I. W., Adler, L. S., Milano, N. J., Egan, P. A., Junker, R. R., ... & Stevenson, P. C. (2019). Chemistry of floral rewards: intra-and interspecific variability of nectar and pollen secondary metabolites across taxa. *Ecological Monographs*, 89(1), e01335.

Peer WA, Murphy AS (2006). Flavonoids as signal molecules: Targets of flavonoid action. In Peer WA, and Murphy AS. (eds.), *The Science of Flavonoids*. Springer, New York, pp. 239-268

Pereboom JJM (2000) The composition of larval food and the significance of exocrine secretions in the bumblebee *Bombus terrestris*. *Insect Soc* 47: 11–20.

Pojarkova, A. I. (1939). *Crataegus* L. In V. L. Komarov, V. L. Komarov, & S. V. Yuzepchuk (Eds.), *Flora of the U.S.S.R.* (Vol. 9, pp. 416–468). Akademija Nauk SSSR.

Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V. et al (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* ; 12(1): 29-36.

Pouvreau A. (2004). *Les insectes pollinisateurs*. Delachaux et Niestlé. 191 pp

Pouvreau A. (1973) - Les ennemis des Bourdons. Etude d'une zoocénose: le nid de Bourdons. *Apidologie*, 4(2); 103 - 148.

Pouvreau A. (1974) - Les ennemis des Bourdons. Organismes affectant les adultes. *Apidologie*, 5(1); 39- 62

Pouvreau A. (1991) - Problèmes pathologiques liés à la fondation des nids et au développement des colonies de Bourdons. Rapport interne.

Pouvreau, A. (2004). *Les insectes pollinisateurs*. Delachaux et Niestlé, Lausanne, Paris, 190pp.

Pouvreau A., & Robert, P. (1989). MALADIES ET PARASITES DES BOURDONS.

Praz, C. J., Müller, A., & Dorn, S. (2008). Specialized bees fail to develop on non-host pollen: do plants chemically protect their pollen. *Ecology*, 89(3), 795-804.

Rasmont P, Coppée A, Michez D, De Meulemeester T (2008) An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). *Ann Soc Entomol Fr* 44: 243–250.

Rasmont, P., Franzén, M., Lecocq, T., Harpke, A., Roberts, S. P., Biesmeijer, J. C., ... & Schweiger, O. (2015). *Climatic risk and distribution atlas of European bumblebees* (Vol. 10, pp. 1-236). Pensoft Publishers.

- Rasmont, P., Regali, A., Ings, T. C., Lognay, G., Baudart, E., Marlier, M., ... & Chittka, L.** (2005). Analysis of pollen and nectar of *Arbutus unedo* as a food source for *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 98(3), 656-663.
- Regali A, Rasmont P** (1995) Nouvelles méthodes de test pour l'évaluation du régime alimentaire chez des colonies orphelines de *Bombus terrestris* L. (Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 26: 273–281.
- Robertson, C.** (1899). Flower visits of oligotrophic bees. *Botanical Gazette*, 28(3), 215-215.
- Robertson, C.** (1925). Heterotrophic bees. *Ecology*, 6(4), 412-436.
- Roulston, T. A. H., Cane, J. H., & Buchmann, S. L.** (2000). What governs protein content of pollen: pollinator preferences, pollen–pistil interactions, or phylogeny?. *Ecological monographs*, 70(4), 617-643.
- Saad, L., Jacquemart, A. L., Cawoy, V., Vanparys, V., Vervoort, A., Meerts, P., Dassonville, N., Domken, S., Mahy, G.** (2009). Les plantes exotiques envahissantes en Belgique ont-elles des impacts? *Parcs & Réserves, Namur, Belgium, Ardenne et Gaume*, 64 : 10-16.
- Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., HuberSanwald, E., Hünneke, L.F., Jackson, R.B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D.M., Mooney, H.A., Österheld, M., Poff, N.L., Sykes, M.T., Walker, B.H., Walker, M., Wall, D.H.** (2000). Biodiversity- global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287: 1770-1774.
- Schindwein, C., Wittmann, D., Martins, C. F., Hamm, A., Siqueira, J. A., Schiffler, D., & Machado, I. C.** (2005). Pollination of *Campanula rapunculus* L.(Campanulaceae): How much pollen flows into pollination and into reproduction of oligolectic pollinators?. *Plant Systematics and Evolution*, 250(3), 147-156.
- Schmid-Hempel, P., Wilfert, L., & Schmid-Hempel, R.** (2019). Pollinator diseases: The bombus–crithidia system. *Wildlife disease ecology: Linking theory to data and application*, 3-31.
- Schoen, D. J., & Lloyd, D. G.** (1992). Self-and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3, Part 1), 381-393.
- Sedivy, C., Müller, A., & Dorn, S.** (2011). Closely related pollen generalist bees differ in their ability to develop on the same pollen diet: evidence for physiological adaptations to digest pollen. *Functional Ecology*, 25(3), 718-725.
- Shirley BW** (1998), Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.* 8: 415-422. 32
- Soltis, P. S., & Soltis, D. E.** (2004). The origin and diversification of angiosperms. *American Journal of Botany*, 91(10), 1614-1626.

- Stout, J.C., Morales, C.L.** (2009). Ecological impacts of invasive alien species on bees. *Apidologie*, 40: 388-409.
- Strickler, K.** (1979). Specialization and foraging efficiency of solitary bees. *Ecology*, 60(5), 998-1009.
- Strong, D. R., Lawton, J. H., & Southwood, S. R.** (1984). *Insects on plants. Community patterns and mechanisms*. Blackwell Scientific Publications.
- Tait, A., Morrison, L. J., Duffy, C. W., Cooper, A., Turner, C. M. R., & Macleod, A.** (2011). Trypanosome genetics: populations, phenotypes and diversity. *Veterinary parasitology*, 181(1), 61-68.
- Tasei JN, Aupinel P** (2008) Nutritive value of 15 single pollens and pollen mixes tested on larvae produced by bumble bee workers (*Bombus terrestris*, Hymenoptera: Apidae). *Apidologie* 39: 397–409.
- Tasei, J. N., & Masure, M. M.** (1978). Factors influencing the development of *Megachile pacifica* Panz (Hymenoptera, Megachilidae)[insect pollinators]. *Apidologie* (France).
- Thomas C.D., Franco A.M.A., Hill J.K.** (2006) Range retractions and extinction in the face of climate warming, *Trends Ecol. Evol.* 21, 415–416.
- Thorp, R. W.** (1969). Ecology and behavior of *Anthophora edwardsii* (Hymenoptera: Anthophoridae). *American Midland Naturalist*, 321-337.
- Tilman D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R., Schindler D., Schlesinger W.H., Simberloff D., Swackhamer D.** (2001) Forecasting agriculturally driven global environmental change, *Science* 292, 281–284
- Traveset, A., Richardson, D.M.** (2006). Biological invasions as disruptors of plant reproductive mutualisms. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 208-216.
- Valkama, E., Koricheva, J., Salminen, J. P., Helander, M., Saloniemi, I., Saikkonen, K., & Pihlaja, K.** (2005). Leaf surface traits: overlooked determinants of birch resistance to herbivores and foliar micro-fungi?. *Trees*, 19(2), 191-197.
- Vanderplanck, M., Leroy, B., Wathelet, B., Wattiez, R., Michez, D.** (2014). Standardized protocol to evaluate pollen polypeptides as bee food source. *Apidologie*, 45(2): 192-204.
- Velthuis HHW, van Doorn A** (2006) A century of advances in bumblebee domestication and the economic and environmental aspects of its commercialization for pollination. *Apidologie* 37: 421–451.
- Velthuis, H.H.W., Alves, D.A., Imperatriz-Fonseca, V., Duchateau, M.J.** (2002). Worker bees and the fate of their eggs. *Proceedings of the Section on Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society*, 13: 97-102.

Vergas FD, Lopez OP (2003). Natural colourants for food and nutraceutical uses. CRC press, USA, 2003, pp. 93-109

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

Westerkamp, C. (1997). Keel blossoms: bee flowers with adaptations against bees. *Flora*, 192(2), 125-132.

Westerkamp, C. H. (1996). Pollen in bee-flower relations some considerations on melittophily. *Botanica Acta*, 109(4), 325-332.

Westerkamp, C., & Classen-Bockhoff, R. (2007). Bilabiate flowers: the ultimate response to bees?. *Annals of botany*, 100(2), 361-374.

Williams P.H., Araújo M.B., Rasmont P. (2007) Can vulnerability among British bumblebee (*Bombus*) species be explained by niche position and breadth? *Biol. Conserv.* 138, 493–505.

Williams, N. M. (2003). Use of novel pollen species by specialist and generalist solitary bees (Hymenoptera: Megachilidae). *Oecologia*, 134(2), 228-237.

Williams, P. H., Cameron, S. A., Hines, H. M., Cederberg, B., & Rasmont, P. (2008). A simplified subgeneric classification of the bumblebees (genus *Bombus*). *Apidologie*, 39(1), 46-74.

Woo HH, Kuleck G, Hirsch AM, Hawes MC. Flavonoids: signal molecules in plant development. In Bela SB, Michael EB. (eds.), *Flavonoids in cell function*, New York, USA, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2002, pp. 51-60.

Xiao, L., Carrillo, J., Siemann, E., & Ding, J. (2019). Herbivore-specific induction of indirect and direct defensive responses in leaves and roots. *AoB Plants*, 11(1), plz003.

Xie Z., Williams P.H., Tang Y. (2008) The effect of grazing on bumblebees in the high rangelands of the eastern Tibetan Plateau of Sichuan, *J. Insect Conserv.* 12, 695–703.

Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N (1997). Flavonoid-Peroxidase Reaction as a Detoxification Mechanism of Plant Cells against H₂O₂. *Plant Physiol.* ; 115:1405-1412. 27.