

Université de Mons
Faculté des Sciences
Laboratoire de zoologie

**Les vergers de merisiers
représentent-ils une pharmacie
naturelle pour les bourdons
parasités ?**

Apolline Michel

MAB2 en Biologie des
organismes et écologie

Année académique :
2021-2022

Directeur de mémoire :

Denis Michez

Co-superviseurs : **Maryse
Vanderplanck & Antoine
Gekière**

Résumé : La pollinisation est un service éco-systémique indispensable à la reproduction sexuée des Angiospermes. Ces derniers attirent les pollinisateurs par la production de pollen et de nectar, représentant des ressources florales nutritives. Paradoxalement, ils comportent également certains composés de défense, les métabolites spécialisés, permettant notamment à la plante de lutter contre une collecte massive de ses ressources ou contre le développement de micro-organismes opportunistes. Ces composés possèdent certaines propriétés antimicrobiennes en conséquence qui pourraient impacter la santé des pollinisateurs parasités. Le potentiel toxique et/ou thérapeutique du pollen du merisier *Prunus avium* (L. 1755) et de ses flavonoïdes sur le bourdon terrestre *Bombus terrestris* (L. 1758) parasité par le trypanosome *Crithidia bombi* (Lipa & Triaggini, 1989) est ici testé. Tout d'abord, une caractérisation et une quantification du profil des métabolites spécialisés présents dans les feuilles, les pétales, le pollen et le nectar de merisier sont réalisées par analyse HPLC/MS-MS. Une extraction massive des flavonoïdes issus du pollen et des feuilles de merisier est également réalisée. Ces deux extraits, supplémentés à du pollen de saule, ainsi que le pollen de merisier pur et le pollen de saule pur (utilisé comme contrôle) sont soumis à des micro-colonies saines et parasitées composées chacune de 5 ouvrières nourries *ad libitum* de ces différentes diètes et de sirop de sucre. Elles en sont nourries pour une période d'élevage de 35 jours durant laquelle la toxicité des flavonoïdes issus du pollen et des feuilles de merisier est évaluée. L'impact de l'infection et de la diète est également mesuré à l'échelle de la micro-colonie par l'analyse du développement de la micro-colonie et de différentes réponses de stress (dilution et efficacité polliniques, éjection larvaire et taux de mortalité des ouvrières). L'évolution de la charge parasitaire est également suivie pour les individus soumis à la diète supplémentée en flavonoïdes issus du pollen de merisier et aux pollens de merisier et de saule. Finalement, une analyse des corps gras permet d'évaluer l'impact du parasitisme et de la diète à l'échelle individuelle. Aux vues des effets bénéfiques observés chez les individus parasités, le pollen de merisier représente une ressource thérapeutique, provoquant une baisse et un retard de l'infection ainsi qu'un bon développement des micro-colonies. Les flavonoïdes issus du pollen de merisier sont quant à eux toxiques, à la fois pour les individus sains et parasités, démontrant qu'ils ne sont pas les métabolites responsables des effets bénéfiques observés pour le pollen de merisier pur. En effet, leur ingestion provoque une précocité de l'infection ainsi qu'une augmentation de la charge parasitaire, en plus d'être toxique pour les individus s'en nourrissant.

Mots-clés : bourdon, *Bombus terrestris*, merisier, *Prunus avium*, parasite, *Crithidia bombi*, thérapeutique, toxicité, médication, flavonoïdes, métabolites spécialisés

Abstract:

Pollination is an essential ecological service for the Angiosperms sexual reproduction, which attract pollinators by the production of nectar and pollen, two nutritive and attractive floral resources. However, they also contain some defence compounds, the specialised metabolites, that notably enable plant to prevent a massive collection of their resource or fight against some opportunist micro-organisms development. Pollen and nectar have consequently some antimicrobial properties that could impact the parasitised pollinator health. The toxic and/or therapeutic potential of the cherry tree pollen *Prunus avium* (L. 1755) and its flavonoids on the buff tailed bumblebee *Bombus terrestris* (L. 1758) parasitised by the trypanosome *Crithidia bombi* (Lipa & Triaggini, 1989) is here tested. A characterisation and quantification of the specialised metabolites profile present in cherry tree leaves, petals, pollen and nectar is carried out by a HPLC/MS-MS analysis, as well as a massive flavonoids extraction from pollen and leaves. The resulting extracts, supplemented to willow pollen used as a control diet, as well as cherry tree pollen and willow pollen were exposed to healthy and parasitised microcolonies. These were composed of 5 workers each and fed ad libitum of these different diets and sugar sirup. They were exposed to the different diet for a 35 days rearing phase where the leaves and pollen flavonoid toxicity was evaluated. The infection and diet impacts were also measured to the microcolony level by the microcolony development analysis as well as some stress responses, as the pollen dilution and efficacy, the larval ejection and the mortality rate of workers. The parasite load evolution was also monitored for individuals fed with the supplemented flavonoids diet as well as the cherry tree and the willow pollen. Finally, a fat body analysis enables the evaluation of the parasitism and diet impact at the individual level. Considering the beneficial effects observed on parasitised individuals, the cherry tree pollen represents a therapeutic resource that causes a decrease and a lateness of the infection as well as a good development of the microcolony. Flavonoids from cherry tree pollen are in contrast toxic for both parasitised and unparasitised individuals, suggesting that they do not are the specialised metabolites class responsible for the beneficial effects observed for pure cherry tree pollen. Indeed, their intake causes the infection earliness and a parasite load increase in addition to be toxic for individuals that consumed it.

Key-words: bumblebee, *Bombus terrestris*, cherrytree, *Prunus avium*, parasite, *Crithidia bombi*, therapeutic, toxicity, medication, flavonoids, specialised metabolites

Remerciements

Ce mémoire de fin d'étude n'aurait pas été réalisable sans de l'aide et l'appui de nombreuses personnes, que je souhaite sincèrement remercier. Tout d'abord, merci à Pierre Rasmont et Denis Michez de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Zoologie et de m'avoir permis d'y réaliser mon mémoire. Je remercie également les membres de laboratoire pour leur accueil et leur gentillesse ainsi que leurs coups de main, que ce soit pour les dissections des micro-colonies en fin d'élevage ou leur aide en analyses statistiques.

Un grand merci également à Maryse Vanderplanck, qui a su être disponible pour nous malgré la distance et pour sa bienveillance, son soutien et ses mots d'encouragement. Merci à Irène Semay pour son travail et pour la réalisation de l'ensemble des analyses chimiques, mais également pour avoir pris le temps de m'accueillir, de me montrer et de m'expliquer plus en profondeur les différentes techniques utilisées.

Un grand merci et beaucoup de gratitude pour Lucie et Clément, avec qui j'ai formé une chouette petite équipe et qui m'ont tenu compagnie et accordé leur aide tout au long de mon mémoire, que ce soit pour la période d'élevage, les galères d'analyses statistiques ou la rédaction. Je suis également reconnaissante envers les autres mémorants du laboratoire, Thomas, Elisa, Jordan et Rémi, pour leur présence, leur soutien et leur bonne humeur qui m'ont permis de traverser cette période un peu rock'n'roll avec plus de légèreté. Merci également à Vincent pour ses visites intempestives à la salle des mémorants, qui me permettaient de prendre un petit break dans ma rédaction ou encore à Margaux, avec qui je passe ma défense orale en juin et avec qui j'ai partagé ces dernières semaines, remplies certes de quelques galères mais surtout de beaucoup de motivation et d'encouragements.

Un grand merci et plein d'amour à mes amis et ma famille pour leur soutien, et tout particulièrement à mon papa, qui m'a transmis son amour de la biologie depuis mon enfance et sans qui je ne me serais probablement pas orientée vers ce choix d'étude que j'affectionne tant.

Enfin et pas des moindres, je remercie de tout cœur Antoine Gekière. Plus qu'un co-superviseur, il a été d'une grande aide et s'est toujours rendu disponible pour nous accorder son appui et son soutien. Sa patience et ses conseils m'ont permis d'avancer en toute sérénité tout au long de mon mémoire et je lui en suis infiniment reconnaissante.

Un tout grand merci à tous.

Table des matières

Chapitre 1 : INTRODUCTION	1
1. Interactions plantes-pollinisateurs	1
1.1. Pollinisation et Angiospermes.....	1
1.2. <i>Prunus avium</i> (L., 1755) et ses relations avec les pollinisateurs	2
1.3. <i>Bombus terrestris</i> (L., 1758)	2
1.4. Importance de la pollinisation et déclin des pollinisateurs.....	3
2. Parasitisme et son impact sur la santé des pollinisateurs	5
2.1. Relations parasitisme – facteurs anthropiques.....	5
2.2. Prévalence, transmission et effets de <i>Crithidia bombi</i> (Lipa & Triaggini, 1989)	6
3. Défenses contre le parasitisme	8
3.1. Défenses immunologiques.....	8
3.2. Défenses non-immunologiques	9
4. Dilemme pollinique et molécules de défense	10
4.1. Occurrence des métabolites spécialisés.....	10
4.2. Fonctions des métabolites spécialisés dans le pollen et le nectar.....	11
4.3. Propriétés thérapeutiques des métabolites spécialisés.....	13
Chapitre 2 : BUTS	15
Chapitre 3 : MATERIEL & METHODES	17
1. Analyses phytochimiques et molécules d'intérêts	17
1.1. Caractérisation du profil des métabolites spécialisés et leur quantification.....	17
1.2. Flavonoïdes	18
2. Essais biologiques	19
2.1. Traitements et protocole expérimental	19
2.2. Préparation des traitements.....	21
3. Mise en place de réservoirs parasitaires et inoculation	22
4. Paramètres mesurés	23
4.1. Dynamique de collecte, réponses de stress et développement des micro-colonies	23

4.2.	Charge parasitaire.....	24
4.3.	Corps gras.....	25
5.	Analyses statistiques.....	26
5.1.	Analyses phytochimiques.....	26
5.2.	Effets dommageables des flavonoïdes sur les bourdons sains.....	26
Chapitre 4 : RESULTATS.....		29
1.	Les flavonoïdes du merisier : parties végétatives et ressources florales	29
2.	Toxicité de la diète sur les bourdons sains	31
3.	Effets du parasite et effets thérapeutiques des flavonoïdes sur les bourdons parasités	36
Chapitre 5 : DISCUSSION.....		43
1.	Profil des flavonoïdes	43
2.	Toxicité des molécules	44
3.	Impact du parasite.....	45
4.	Impact de la diète sur la charge parasitaire.....	47
5.	Interactions diète - parasite	47
Chapitre 6 : CONCLUSION		51
Chapitre 7 : REFERENCES		1
Annexe I – Elevage des micro-colonies.....		14
Annexe II – Analyses chimiques.....		16
Annexe III – Protocoles expérimentaux		18
Annexe IV – Compléments de résultats.....		20

Chapitre 1 : INTRODUCTION

1. Interactions plantes-pollinisateurs

1.1. Pollinisation et Angiospermes

Début Crétacé, la végétation dominante était encore composée de fougères typiques du Jurassique et de Gymnospermes avant de se transformer et de laisser place aux angiospermes durant le Mi-Crétacé, dont la distribution est devenue caractéristique et dominante à l'échelle mondiale depuis cette époque (De Bodt et al., 2005). Les angiospermes représentent à ce jour la majorité des espèces de plantes terrestres. Leur succès évolutif résulte d'une coévolution avec les pollinisateurs et cette interaction mutualiste nommée la pollinisation s'est de plus en plus spécialisée au cours du temps. Les plantes pollinisées par des vecteurs biotiques produisent du pollen et du nectar, qui constituent une récompense florale attractive pour les pollinisateurs qui s'en nourrissent. Les plantes bénéficient quant à elles d'une fécondation grâce au transport de pollen effectué par les pollinisateurs, permettant donc une reproduction sexuée par le dépôt de pollen (produit par les structures mâles de la fleur, les anthères) sur le pistil de la fleur (structure femelle). De nombreux animaux contribuent à la pollinisation, comme les oiseaux, les mammifères ou encore certaines espèces de reptiles (eg. Goldingay et al., 1991; Subramanya & Radhamani, 1993; Pérez-Mellado & Casas, 1997). C'est cependant la pollinisation par les insectes, à savoir l'entomophilie qui représente le mode de pollinisation le plus répandu (Pacini, 2008). De nombreuses espèces de Coleoptera, de Lepidoptera et de Diptera contribuent à la pollinisation (eg. Reddi & Bail, 1984; Mawdsley, 2003; Ssymank, 2008) mais ce sont en très grande majorité les Hymenoptera qui effectuent ce service, en particulier les Anthophila (Hristov et al., 2020), qui représentent les pollinisateurs les plus importants. *Apis mellifera*, l'abeille domestique, est tout particulièrement un pollinisateur important pour la pollinisation, assurant approximativement 80% de la totalité de la pollinisation entomophile en agriculture (Robinson & Morse, 1989). La diversité des pollinisateurs est cependant primordiale pour assurer une pollinisation efficace. En effet, l'efficacité de la pollinisation augmente avec la diversité de pollinisateurs et la visite de pollinisateurs sauvages, notamment dans les vergers de *Prunus avium* (Eeraerts et al., 2020).

1.2. *Prunus avium* (L., 1755) et ses relations avec les pollinisateurs

Aussi connu sous le nom de merisier ou cerisier des oiseaux, *P. avium* fait partie de la Famille des Rosaceae. Il est largement cultivé pour ses fruits, mondialement consommés. Le merisier est également connu pour ses nombreuses propriétés pharmacologiques et son potentiel thérapeutique étant donné sa richesse en divers composés nutritifs et phytochimiques (e.g. Dirlewanger *et al.*, 2012).

Le merisier est en majorité pollinisé par des pollinisateurs issus de populations commerciales, tels que les abeilles mellifères, les bourdons et les osmies (Mateos-Fierro *et al.*, 2022). C'est cependant la visite de pollinisateurs sauvages, notamment les abeilles solitaires, qui permet une pollinisation efficace, étant donné leur meilleure efficacité de pollinisation par visite, mais également un meilleur rendement de visite par minute et une meilleure probabilité de visite florale entre différents arbres et de contact avec le stigma (Eraerts *et al.*, 2020). Les bourdons qui sont à la fois des pollinisateurs commerciaux et des espèces sauvages naturellement présentes dans la nature, montrent également une efficacité de visites florales inférieure à l'efficacité des espèces solitaires (Eraerts *et al.*, 2020). Les reines sauvages visitent cependant un nombre plus élevé de fleurs par minute par rapport à de nombreuses abeilles solitaires et les comportements de butinage des bourdons sont importants pour la pollinisation croisée, étant plus à même à effectuer des visites florales entre différents arbres (Mateos-Fierro *et al.*, 2022).

1.3. *Bombus terrestris* (L., 1758)

Les bourdons sont des pollinisateurs communs, à la fois sauvages et domestiqués à but commercial. *Bombus terrestris* est l'espèce de bourdon la plus commune dans le paléartique-ouest. Elle est hautement polylectique (pollinisation non-spécialiste) et est capable de polliniser une large gamme d'espèces de plantes telles que les Ericaceae, Rosaceae ou Fabaceae (Gurel *et al.*, 2008 ; Rasmont *et al.*, 2008).

B. terrestris est une espèce eusociale annuelle dont la colonie se forme début printemps lorsque la reine émerge de la diapause (*Fig. 1*). Aussitôt que les premières ouvrières émergent, elles aident la reine à établir la colonie et participent à la récolte de pollen et de nectar. Dès que le nombre d'ouvrières actives est suffisant, la reine se restreint uniquement à un rôle reproductif tandis que les ouvrières effectuent l'entretien du nid, la récolte de nourriture et prennent soin des larves et du couvain (Sladen, 1912 ; Goulson, 2010). La colonie prospère jusqu'à la fin de

l'été où elle atteint la fin de son cycle. La reine produit alors quelques reines filles et des individus mâles. Les jeunes reines, une fois fécondées, entrent en diapause durant 6 à 9 mois selon les températures printanières dans le but d'hiberner durant l'hiver tandis que la vieille reine et sa colonie périssent. Les reines ayant survécu à l'hiver forment une nouvelle colonie le printemps suivant une fois sorties de diapause (Alford, 1975).

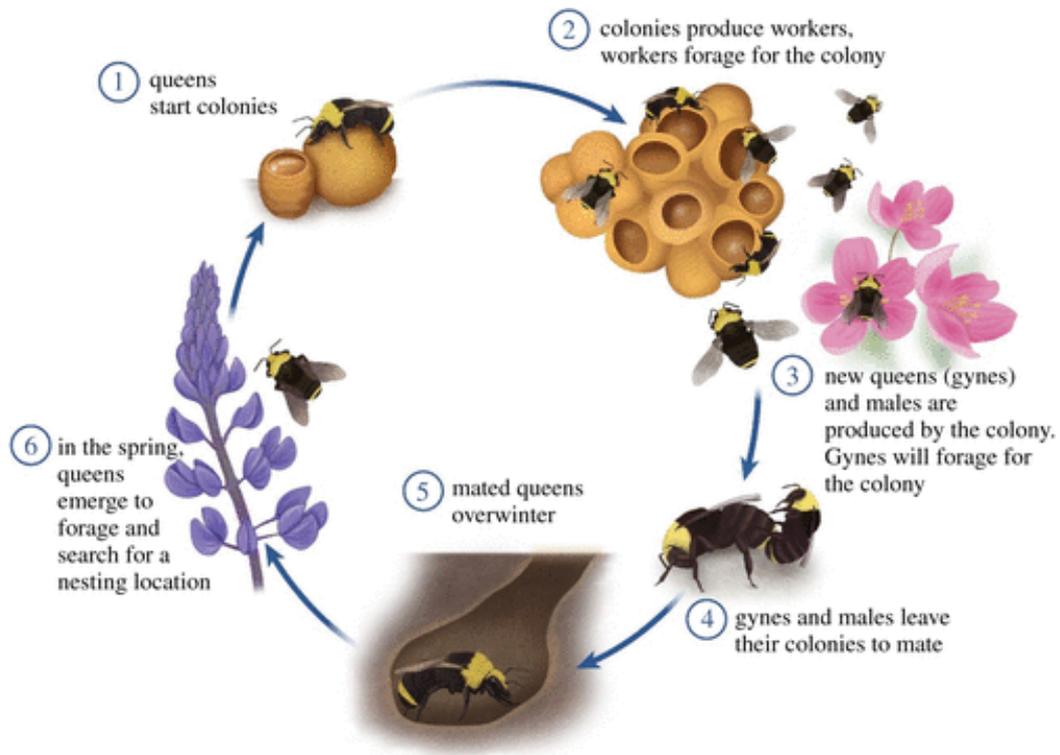


Figure 1 : Cycle de vie des bourdons. (Muth, 2021). **1.** Les reines initient une nouvelle colonie **2.** Lorsqu'un nombre suffisant d'ouvrières est atteint, la reine se restreint à un rôle reproductif tandis que les ouvrières butinent et s'occupent du développement de la colonie **3.** Lorsque la colonie arrive en fin de cycle, la reine produit des mâles et quelques reines filles **4.** Les reines filles et les mâles quittent la colonie et s'accouplent **5.** Les reines fécondées trouvent un site sûr et entrent en diapause pour l'hiver **6.** Les reines émergent le printemps suivant en recherche de nourriture et d'un site de nidification. Crédits d'illustration : Ann Sanderson

1.4. Importance de la pollinisation et déclin des pollinisateurs

Les pollinisateurs jouent un rôle fondamentalement important du fait des services écosystémiques qu'ils procurent. La pollinisation des plantes sauvages et des cultures est vitale, écologiquement et économiquement parlant, pour préserver la diversité et les communautés de plantes sauvages (Ashman *et al.*, 2004) et la productivité agricole (Giannini *et al.*, 2015; Klein *et al.*, 2007). En effet, 85% des espèces de plantes sauvages sont dépendantes des pollinisateurs pour leur reproduction et voient leur productivité décliner en l'absence de pollinisation (Ollerton *et al.*, 2011). Le rendement agricole est également largement dépendant de la pollinisation. La

pollinisation biotique est indispensable pour 75% des cultures nécessaires à la production alimentaire humaine mondiale (Klein *et al.*, 2007) et est économiquement estimée à 153 milliards \$ par an, soit 9.5% de la production mondiale de ressources alimentaires destinées à l'homme en 2005 (Galai *et al.*, 2009). Le déclin des populations de pollinisateur est donc plus que problématique.

Le déclin des pollinisateurs est causé par de nombreux facteurs (*Fig. 2*). Le réchauffement climatique cause de nombreux bouleversements écologiques et les populations de pollinisateurs n'échappent pas à son impact. Il provoque non seulement un décalage spatial de la distribution et de migrations de certaines espèces (Rasmont *et al.*, 2015) mais également une désynchronisation de la floraison des fleurs et du premier jour d'émergence des femelles, causant une diminution de la disponibilité en ressource alimentaire pour les pollinisateurs et une réduction de la pollinisation pour les plantes (Hegland *et al.*, 2009).

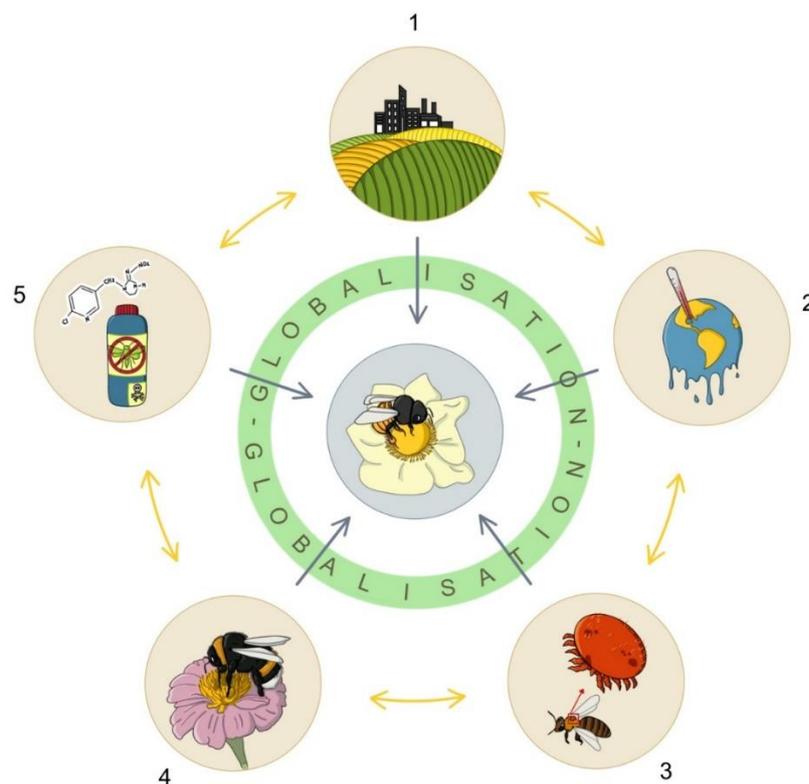


Figure 2 : Schéma des différents facteurs de stress responsables du déclin des pollinisateurs (Noël *et al.*, 2018.) **1.** Fragmentation des habitats et urbanisation **2.** Réchauffement climatique qui provoque la migration de certaines populations et une désynchronisation de la floraison des fleurs et du jour d'émergence des ouvrières **3.** Parasitisme qui affaiblit les pollinisateurs **4.** Présence d'espèces invasives qui entrent en compétition pour les ressources alimentaires et les sites de nidifications avec les populations sauvages **5.** Utilisation intensive de pesticides et leurs effets neurotoxiques. Les flèches jaunes représentent les interactions entre les différents facteurs du déclin et les flèches bleues représentent leur impact direct sur les pollinisateurs. Crédits d'illustration : Carolina Levicek

L'utilisation intensive de pesticides dans les zones agricoles représente également une préoccupation majeure et de nombreuses investigations ont été menées concernant leur potentiel rôle et implication dans la santé des pollinisateurs, en particulier les néonicotinoïdes (classe de pesticides dont la structure est semblable à la nicotine). Leurs effets neurotoxiques peuvent être mortels pour les individus étant donné la paralysie qu'ils provoquent (Jeschke et al., 2011). Une exposition aux résidus de néonicotinoïdes peut impacter la longévité, la réponse immune, le taux de reproduction et globalement les mécanismes métaboliques et physiologiques des individus, les affaiblissant et les rendant plus susceptibles à d'autres facteurs de stress (e.g. Decourtye & Devillers, 2010). D'autres facteurs influencent la santé des pollinisateurs, comme la fragmentation de leurs habitats due à l'urbanisation, la présence d'espèces de plantes et de pollinisateurs invasifs qui provoquent une compétition pour les ressources alimentaires et les sites de nidification avec les populations natives (Goulson, 2003) ou encore les interactions avec des parasites dont la dynamique est modifiée par les activités humaines (Meeus *et al.*, 2018).

2. Parasitisme et son impact sur la santé des pollinisateurs

2.1. Relations parasitisme – facteurs anthropiques

Le parasitisme est un phénomène naturel très courant chez les pollinisateurs. De nombreuses espèces de parasites et d'agents pathogènes tels que les acariens, les protozoaires, les nématodes ou encore certains champignons tels que les microsporidies sont capables de les parasiter et sont largement présentes dans leurs populations (e.g. Genersch, 2010; Core *et al.*, 2012; Schwarz *et al.*, 2015). Les stress provoqués par les activités anthropiques accentuent cependant leurs effets négatifs et font du parasitisme une des causes majeures du déclin des pollinisateurs (Goulson *et al.*, 2015). En effet, les activités anthropiques sont responsables de nombreux stress pour les pollinisateurs (urbanisation, réchauffement climatique, utilisation de pesticides, c.f. 1.4. Importance écologique et économique de la pollinisation) qui interagissent entre eux de manière antagoniste ou synergique, provoquant l'accentuation de leurs effets néfastes (Meeus *et al.*, 2018). De plus, l'activité humaine influe également de manière directe sur la dynamique de population des parasites, par l'introduction de colonies commerciales parasitées. Les effets du parasitisme sont divers et variés selon l'hôte et l'espèce de parasite mais ils engendrent globalement une diminution du fitness de l'hôte.

La virulence de l'infection et la prévalence de certains parasites sont variables et dépendantes de nombreux facteurs. L'exposition chronique des colonies à certains pesticides répandus dans ces zones agricoles peut impacter les relations hôte-parasite en provoquant une augmentation de la prévalence parasitaire due à la diminution de l'efficacité immunitaire des pollinisateurs (Pamminger *et al.*, 2018). Un autre paramètre impactant fortement la propagation de parasites est la présence de pollinisateurs commerciaux. Pour assurer un rendement similaire malgré le déclin des espèces sauvages, des populations d'abeilles mellifères et d'autres pollinisateurs élevés à grande échelle dans un but commercial sont introduites dans les zones agricoles et les serres de production (Whittington & Winston, 2004 ; Garibaldi *et al.*, 2009). Si elles sont infectées, elles représentent une population réservoir hôte pour les parasites, capables par la suite d'infecter les populations sauvages et natives de pollinisateurs par un phénomène de spillover parasitaire (Power & Mitchell, 2004), entraînant une hausse de la transmission parasitaire chez ces populations (Otterstatter & Thomson 2008 ; Cameron *et al.* 2016) Des phénomènes de spillback depuis les populations natives sont également en cause (Pereira *et al.*, 2021). Dans ce cas de figure, la transmission se produit depuis les populations natives vers les populations commerciales. Ces dernières représentant des populations de très haute densité, la prévalence parasitaire y devient importante. Une nouvelle transmission s'effectue depuis les pollinisateurs commerciaux alors lourdement parasités vers les pollinisateurs sauvages, menant à une hausse de la prévalence parasitaire chez les populations natives. (Daszak *et al.*, 2000 ; Graystock *et al.*, 2016).

2.2. Prévalence, transmission et effets de *Crithidia bombi* (Lipa & Triaggini, 1989)

Un parasite commun des communautés de bourdon est *Crithidia bombi*. Il appartient à la Famille des Trypanosomidae et est un organisme kinétoplastidé flagellé unicellulaire eucaryotique (Simpson *et al.*, 2006) infestant le tube digestif de son hôte. Il est présent préférentiellement au niveau de la partie postérieure de l'intestin (Koch *et al.*, 2019) et y vit sous 3 formes : une forme promastigote qui apparaît durant le début de l'infection avant de laisser place aux formes choanomastigote, mobile et pourvue d'un flagelle, et amastigote, sphérique et non mobile caractérisée par l'absence de flagelle (Lipa *et al.*, 1988 ; Logan *et al.*, 2005). Les cellules se reproduisent majoritairement de manière clonale, mais sont également

capables de reproduction sexuée (Schmid-Hempel *et al.*, 2011). La prévalence de *Crithidia* varie de 10 à 30% mais peut atteindre jusque 80% pour les populations vivant à proximité des zones agricoles et des serres de production (Shykoff & Schmidhempel, 1991), ces milieux représentant des zones de haute densité florales et de pollinisateurs, ce qui augmente la densité parasitaire et par conséquent sa prévalence.

La contamination de *Crithidia* est extracellulaire et résulte en de nombreuses cellules infectieuses alignées le long de la paroi digestive, où les cellules se nichent pour continuer leur transformation. Le pic de l'infection est atteint environ 9.5 jours après l'inoculation (Imhoof & Schmid-Hempel, 1999). Une reine et sa colonie peuvent être infestées via un transfert horizontal lorsque des cellules infestées sont ramenées au nid après la visite de fleurs contaminées (Durrer & Schmid-Hempel, 1994), mais également via les fèces ou des éléments du nid infestés qui provoquent une transmission au sein même de la colonie (Fig. 3). Les larves jouent également un rôle dans la dynamique de transmission. Malgré qu'elles ne montrent aucun signe d'infection, elles sont capables d'infecter des ouvrières saines et d'agir comme un réservoir de transmission étant donné les interactions qu'elles entretiennent avec les ouvrières s'en occupant (Folly *et al.*, 2017). Une transmission verticale peut également être en cause, des individus sexués vers leurs progénitures, comme lorsque des reines filles infestées passent l'hiver et infectent leur colonie lors de la formation de cette dernière au printemps suivant (e.g. Schmid-Hempel, 1998). Toutefois, aucune transmission transovarienne n'a pu être observée.

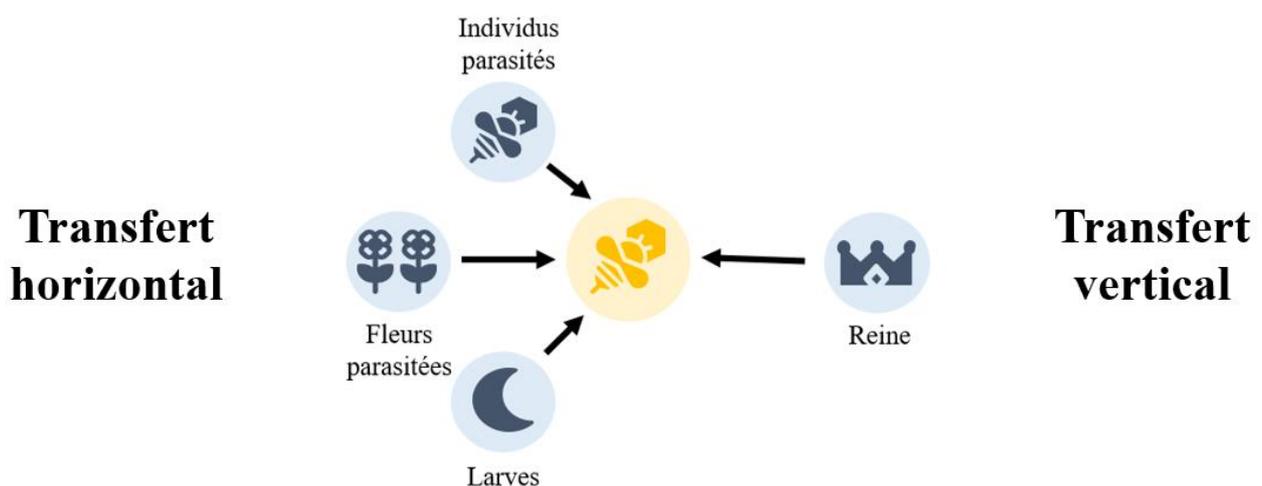


Figure 3 : Schéma des différents facteurs de transmission de *Crithidia*. Il peut être transmis par (i) transfert horizontal via les fèces d'individus parasités, la visite de fleurs parasitées ou via des interactions avec des larves porteuses ou (ii) par transfert vertical, depuis les individus sexués parasités.

Crithidia est responsable d'une baisse de fitness de l'hôte et d'une modification de leur allocation de ressources. Plus de ressources sont attribuées aux corps gras, au détriment du

système reproducteur (Brown *et al.*, 2000), avec comme conséquence une diminution de la taille des ovaires et de la production des mâles par les reines (Shykoff & Schmid-Hempel, 1991), impactant négativement la formation de nouvelles colonies (Brown *et al.*, 2003). *Crithidia* exerce également un effet sur les processus cognitifs impliquant l'apprentissage des couleurs des fleurs à récompenses, diminuant l'efficacité de la recherche de nourriture et impactant ainsi la nutrition des individus pour *B. impatiens* (Gegeer *et al.*, 2006). De plus, les individus infestés visitent en moyenne un nombre de fleurs moins élevé par minute que les individus sains, impactant ainsi les interactions plantes-pollinisateurs et le taux de reproduction au sein des colonies (Otterstatter *et al.*, 2005). L'affaiblissement des hôtes causé par l'infection n'est pas directement mortel mais la virulence de l'infection dépend des conditions environnementales et peut être conséquente chez les individus sous conditions de stress. Le taux de survie est par exemple diminué de 50% chez les individus sous stress nutritif (Brown *et al.*, 2000), suggérant un phénomène synergique entre les deux facteurs de stress. L'exposition chronique aux résidus de néonicotinoïdes peut également interagir avec une infection par *Crithidia* pour les reines parasitées et impacter leur taux de survie (Fauser-Misslin *et al.*, 2014). Le développement et le fitness de la colonie étant étroitement lié à la condition de la reine fondatrice, cette synergie provoque des effets préjudiciables pour la formation de nouvelles colonies. Ainsi, malgré une basse virulence en conditions normales, *Crithidia* peut donc avoir un impact conséquent dans la dynamique de population de bourdons et ce d'autant plus que les populations sont soumises à d'autres facteurs de stress, dont les effets se combinent et s'exacerbent.

3. Défenses contre le parasitisme

3.1. Défenses immunologiques

Pour lutter contre le parasitisme et minimiser son impact, le système immunitaire met en place certaines réponses immunes. Il se repose principalement sur des réponses immunes innées qui ont lieu au niveau de la barrière épithéliale et des tissus immunitaires tels les corps gras et de l'hémolymphe (Gillespie *et al.*, 1997). Ce système immunitaire inné est principalement composé de deux types de réponses : la réponse cellulaire et la réponse humorale (Tsakas & Marmaras 2010; Rosales, 2017). La réponse cellulaire, mise en place dès le début de l'infection, est médiée par les hémocytes qui permettent les processus d'encapsulation, de phagocytose et

de nodulation de bactéries, nématodes et protozoaires (Strand, 2008) tandis que la réponse humorale, mise en place après la réponse cellulaire, permet la synthèse de peptides antimicrobiens, synthétisés au niveau des corps gras, transportés via l'hémolymphe et permettant la dégradation d'agents microbiens (Rolff & Schmid-Hempel, 2016 ; Lai & Gallo, 2009). Elle permet également l'activation de la cascade enzymatique de la prophenoloxdase permettant la mélanisation (Gillepsie *et al.*, 1997).

De nombreux facteurs influencent l'efficacité de la réponse immune et par conséquent l'impact du parasite sur le fitness de l'hôte. L'âge de l'individu, la caste, la sociabilité de l'individu, le sexe, la phase de vie, la taille de la colonie, l'exposition à certains pesticides, le microbiote intestinal ou encore la nutrition impacte de nombreux mécanismes immunitaires, que ce soit l'activité du système phénoloxdase, la synthèse de peptides antimicrobiens ou encore la capacité d'encapsulation (e.g., Sadd & Barribeau, 2013 ; Ruiz-González *et al.*, 2022).

3.2. Défenses non-immunologiques

Différents mécanismes de défenses non-immunologiques, tels certains mécanismes comportementaux, constituent une défense à l'échelle de la colonie, à l'inverse de défense à l'échelle individuelle composée de réactions physiologiques, chimiques et immunologiques citées précédemment. Chez les bourdons, des mécanismes comportementaux sont mis en place pour limiter la transmission de parasites (Nicholls *et al.*, 2022), comme la reconnaissance de fleurs parasitées par *Crithidia* qui permet aux individus d'adapter leur comportement de butinage en conséquence et d'éviter la visite de ces fleurs (Fouks *et al.*, 2011).

De la même manière, les individus sont capables d'adapter leur nutrition lorsqu'ils sont parasités en ingérant certains composés aux propriétés thérapeutiques pour lutter contre l'infection parasitaire. Si ces comportements sont volontaires, on parle alors d'automédication. L'automédication est un type de plasticité adaptative qui consiste en un changement spécifique de comportement en réponse à une maladie ou au parasitisme et qui permettrait aux individus d'améliorer leur probabilité à survivre et à se reproduire (Singer *et al.*, 2009). Les comportements d'automédication sont la plupart du temps innés (Abbott, 2014 ; de Roode *et al.*, 2013). Pour qu'un comportement soit qualifié d'automédication, (i) seuls les individus infectés doivent pratiquer le comportement thérapeutique, (ii) ce comportement doit alléger la potentielle perte de fitness des individus infectés, (iii) le comportement thérapeutique provoque

une baisse du fitness chez les individus sains et finalement (iv) le parasite ne peut profiter du comportement (Clayton & Wolf, 1993).

L'automédication chez les insectes par l'ingestion de molécules contenues dans les plantes est un phénomène largement documenté à l'heure actuelle. Les abeilles (e.g. Ferguson *et al.*, 2018), les mouches (eg : Kacsoh *et al.*, 2013 ; Milan *et al.*, 2012), les fourmis (Bos *et al.*, 2015) et les papillons (Lefèvre *et al.*, 2012), pour ne citer qu'eux, sont capables d'utiliser une large gamme de ces molécules dans le but d'augmenter leur tolérance et leur résistance aux infections. Différents types de comportements sont adoptés selon la situation, telle que la médication thérapeutique, qui se produit lorsque l'individu est parasité et permet de diminuer l'infection (Singer *et al.*, 2009), la médication prophylactique, qui consiste à prévenir les infections et d'en diminuer les risques (Chapuisat *et al.*, 2007; Lefèvre *et al.*, 2010), et l'alimentation compensatoire, qui est une adaptation de la nutrition d'un individu dans le but de compenser la perte de nutriments causée par le parasitisme (Bernardo & Singer, 2017).

4. Dilemme pollinique et molécules de défense

4.1. Occurrence des métabolites spécialisés

Ces composés aux potentielles vertus thérapeutiques produits par les plantes sont en fait des molécules de défense toxiques nommées les métabolites spécialisés hautement impliqués dans les relations interspécifiques. Leurs compositions et concentrations varient selon l'espèce, le tissu floral et sa fonction mais également selon les conditions environnementales (e.g. Figueredo *et al.*, 2008 ; Palmer-Young *et al.*, 2019). En effet, la plante est composée d'une part de tissus végétatifs, à savoir les feuilles, tiges et racines dont le rôle est énergétique et structural, et d'autre part de tissus floraux à rôle reproductif. La présence de composés de défenses dans les tissus végétatifs, sujets à l'herbivorie, s'explique comme une réponse adaptative face aux herbivores (e.g. Fraenkel, 1959). Le pollen et le nectar représentent eux une ressource essentielle à la survie des pollinisateurs du fait de leur composition en carbohydrates, lipides, protéines, sels minéraux, vitamines et acides aminés (Vivino *et al.*, 1954 ; Pacini *et al.*, 2003). Paradoxalement, ils comportent également ces métabolites spécialisés aux propriétés multiples, pouvant potentiellement impacter les pollinisateurs, notamment négativement (Jacobsen & Raguso, 2018).

4.2. Fonctions des métabolites spécialisés dans le pollen et le nectar

La présence de ces composés dans les ressources florales peut éventuellement s'expliquer par un spillover physiologique de ces composés depuis les tissus avoisinants, ensuite transportés via les fluides vasculaires entre les différents tissus (*Fig. 4 : 1. Pléiotropie*). La présence de métabolites spécialisés dans le pollen et le nectar est cependant plus probablement due à une réponse adaptative à d'autres facteurs de stress, tels la dégradation par les UVs ou la dessiccation (Pacini & Hesse, 2005). En effet, le taux et la composition de ces composés diffèrent entre les différents tissus tels que les pétales, les feuilles, le pollen ou encore le nectar (Bonora *et al.*, 1988 ; Manso *et al.*, 2012) suggérant une adaptation au moins partielle de l'allocation de ces composés en fonction du tissu (e.g. Li *et al.*, 2016).

La présence de métabolites de défense peut également être expliquée par la richesse nutritive des grains de pollen et du nectar propice au développement de divers micro-organismes opportunistes telles que des communautés de levures et de bactéries nectarivores (Fridman *et al.*, 2012 ; Herrera *et al.*, 2009) (*Fig. 4 : 2. Micro-organismes*). Leur présence peut impacter la composition physicochimique du pollen et du nectar et par conséquent l'attraction des pollinisateurs envers la ressource florale, aux vues des perturbations que leur présence peut provoquer envers les relations plantes-pollinisateurs lorsque ces communautés microbiennes sont présentes dans le nectar (Schmitt *et al.*, 2021). Elles peuvent également réduire le taux de germination des grains de pollen et impacter l'adhésion du pollen aux pollinisateurs et aux stigmas (Eisikowitch *et al.*, 1990). Pour toutes ces raisons, les plantes pourraient être susceptibles de produire des composés de défense dans le but de minimiser l'impact de la présence de ces communautés de micro-organismes. En effet, le pollen possède des propriétés anti-microbiennes (e.g. Abouda *et al.*, 2011), suggérant une sélection de ces composés dans le but de protéger le pollen et le nectar des micro-organismes.

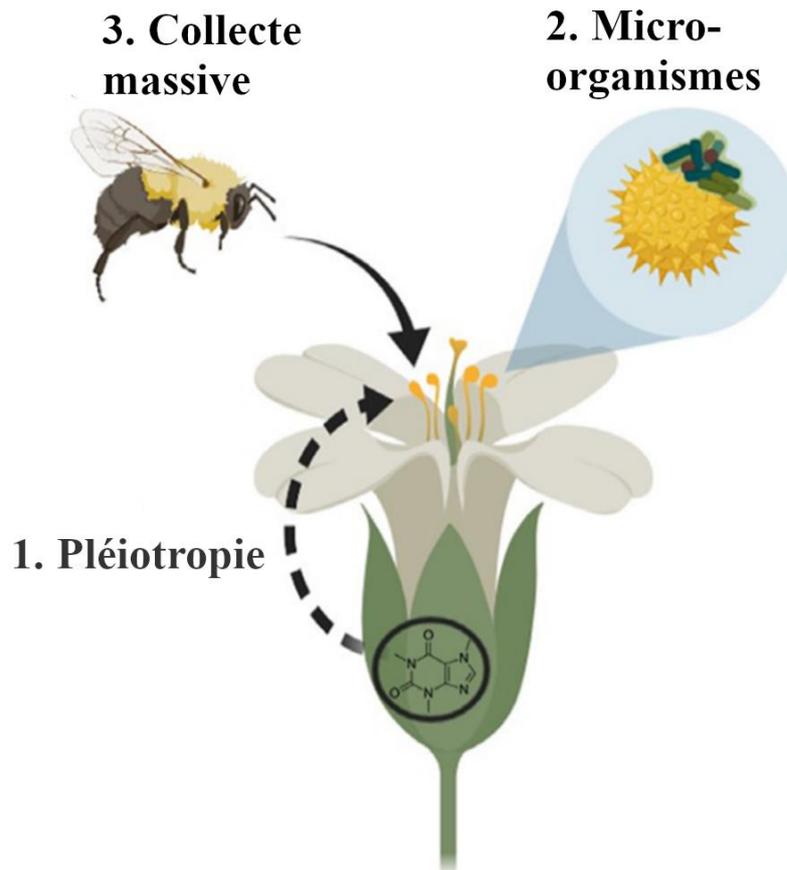


Figure 4 : Schéma des trois hypothèses concernant l'occurrence des métabolites spécialisés dans le pollen et le nectar (figure adaptée de Rivest & Forst, 2020). La présence de métabolites spécialisés dans le pollen peut être due à **1**. Un spillover physiologique de ces composés depuis d'autres tissus **2**. Une réponse adaptative de la plante face à la collecte massive de pollen par certains pollinisateurs **3**. Une réponse adaptative de la plante face aux micro-organismes opportunistes qui se développent sur le pollen et peuvent interférer avec les relations plantes- pollinisateurs

La présence de métabolites de défense serait également une réponse adaptative permettant d'empêcher une collecte trop excessive de pollen et de limiter la prise de ressource par les pollinisateurs et autres organismes opportunistes (*Fig. 4 : 3. Collecte massive*). En effet, certains pollinisateurs, malgré leur consommation, contribuent peu à la pollinisation et sont appelés les voleurs de pollen. Certaines espèces d'abeilles en font partie et sont même les voleurs de pollen les plus communs (Hargreaves *et al.*, 2009). Elles extraient une portion plus importante de pollen que les autres taxons de pollinisateurs étant donné leurs besoins particuliers, nécessitant du pollen non seulement pour se nourrir mais également pour contribuer au développement larvaire (Michener, 2000). De plus, elles déposent une quantité plus faible de pollen lors de leur visite florale suivante (e.g. Schlindwein *et al.*, 2005). Les plantes tireraient donc profit à minimiser ou empêcher la collecte de pollen, même pour les pollinisateurs légitimes, et contiendraient des molécules de défense, de même que certaines protéines et métaux dans ce but (Boyd *et al.*, 2007 ; Praz *et al.*, 2008 ; Silva *et al.*, 2020). Les

plantes ayant déjà des structures anatomiques développées dans le but de limiter la récolte excessive de pollen (Harder & Thomson, 1989), l'hypothèse que les défenses chimiques auraient de la même manière évolué en ce sens est vraisemblable. L'étude de Wang *et al.* (2019) est favorable à cette théorie : les bourdons butinant sur des fleurs dont le pollen comprend des saponines de défense déchargent une proportion plus importante de pollen au niveau des stigma des autres fleurs lors de leurs visites florales suivantes (Wang *et al.*, 2019). Ce rejet de la ressource nutritive reste cependant défavorable pour les communautés florales, poussant à la sélection de la production de métabolites à des concentrations non détectables (Tiedeken *et al.*, 2014) ou qui n'ont pas de conséquences digestives directes. La présence de métabolites secondaires nocifs peut cependant avoir un impact positif sur la relation plante-pollinisateur. Par exemple, la présence de grayanotoxin I permet de réduire la compétition entre les bourdons et les espèces invasives étant donné leur différence de résistance face à ce composé, les bourdons s'y accommodant au détriment des espèces invasives (Tiedeken *et al.*, 2016). L'effet positif majeur de la présence de ces composés pour les pollinisateurs réside cependant en leur impact sur le parasitisme chez les pollinisateurs infectés, étant donné leurs propriétés antimicrobiennes discutées précédemment.

4.3. Propriétés thérapeutiques des métabolites spécialisés

Différentes classes de métabolites spécialisés sont déjà connues pour leurs effets thérapeutiques et leur utilisation en médecine moderne tels qu'entre autre les terpénoïdes, les composés phénoliques, les flavonoïdes ou les alcaloïdes qui sont notamment responsables d'effets antioxydants, anti-inflammatoires, anti-carcinogènes, antibactériens, antifongiques, et améliorent l'efficacité des réponses immunes (Velu *et al.*, 2018). Ces propriétés pourraient donc également bénéficier aux pollinisateurs se nourrissant de pollen pour lutter contre les effets négatifs qu'entraînent le parasitisme.

Par exemple, les alcaloïdes permettent une nette diminution de la charge parasitaire chez les individus contaminés par *Crithidia bombi* (Manson *et al.*, 2010). Les alcaloïdes, tel que l'anabasine issu de plants de tabac, réduit la charge parasitaire de près de 80%. Aucun effet significatif n'a cependant été constaté sur le fitness des individus (Richardson *et al.*, 2015). Le catalpol et le thymol permettent également une diminution de la charge parasitaire d'environ 60%. Les plants de tabac contiennent également de la nicotine, qui permet de retarder l'infection

au niveau du tube digestif de quelques jours (Baracchi *et al.*, 2015). La callunene issue de *Calluna vulgaris* est également très efficace face à *Crithidia*. Une exposition à la callunene provoque la perte du flagelle et par conséquent la perte de l'infectiosité du pathogène (Koch *et al.*, 2019). Certaines molécules ou pollen peuvent en revanche provoquer l'effet inverse et augmenter la charge parasitaire chez les individus infectés, tels les phénolamides issus du pollen de tournesol ou encore la nicotine (Thorburn *et al.* 2015 ; Gekière *et al.*, 2022). Le but de ce mémoire est de déterminer si les métabolites spécialisés produits par *Prunus avium*, et particulièrement ses flavonoïdes, possèdent également des propriétés thérapeutiques et médicinales face au parasitisme dont est atteint *Bombus terrestris*.

Chapitre 2 : BUTS

Ce mémoire s'inscrit dans le projet ARC-Metaflora, qui fait intervenir les Laboratoires de Zoologie (Prof. P. Rasmont et Prof. D. Michez ; UMONS), de Synthèse Organique et Spectrométrie de masse (Prof. P. Gerbaux ; UMONS) et de Chimie Thérapeutique et Pharmacologie (Prof. Pierre Duez ; UMONS) et qui a pour but d'étudier et établir le potentiel thérapeutique ou nocif de métabolites spécialisés issus de différentes espèces de plantes. Les modèles biologiques étudiés dans le cadre de ce mémoire sont le merisier *Prunus avium* (L., 1755), le bourdon terrestre *Bombus terrestris* (L., 1755) et le trypanosome *Crithidia bombi* (Lipa & Triaggini, 1989). L'objectif final de ce mémoire est d'une part (i) de déterminer la nature et la concentration des différents composés que comportent les feuilles, les pétales, le pollen et le nectar du merisier et de comparer la toxicité de ces composés entre les feuilles et le pollen et d'autre part (ii) de déterminer si le pollen de merisier, et particulièrement ses flavonoïdes, possèdent des propriétés thérapeutiques ou nocifs chez *Bombus terrestris* (L., 1755) non parasité ou parasité par *Crithidia bombi* (Lipa & Triaggini, 1989), à l'échelle individuelle et de la micro-colonie. Différentes questions de recherche et hypothèses associées sont abordées (Fig. 5) :

- **Question 1 - Distribution des flavonoïdes dans les différents tissus** : une caractérisation des profils chimiques des feuilles, des pétales, du nectar et du pollen de merisier est réalisée afin de déterminer la distribution et la quantification de ces molécules au sein des différents tissus.
- **Question 2 – Comparaison de la toxicité des flavonoïdes selon le tissu** : la toxicité des flavonoïdes issus du pollen et des feuilles de merisier est comparée. Etant donné leur différence fonctionnelle, la toxicité des extraits foliaires de flavonoïdes est attendue plus élevée que la toxicité des flavonoïdes issus du pollen.
- **Question 3 - Impact du pollen de merisier et de ses flavonoïdes sur les bourdons sains**, à l'échelle individuelle et de la micro-colonie : l'ingestion du pollen et de ses composés, en particulier ses flavonoïdes, devrait posséder une toxicité non-nulle chez les individus sains et provoquer chez ces derniers des effets préjudiciables.

- **Question 4 - Impact du pollen de merisier et de ses flavonoïdes sur les bourdons parasités ainsi que sur le parasite lui-même**, à l'échelle individuelle et de la micro-colonie : l'ingestion de ces composés devrait impacter négativement le parasite en diminuant sa charge et/ou en diminuant les effets de l'infection et avoir un effet thérapeutique en améliorant le fitness de l'hôte en conséquence.

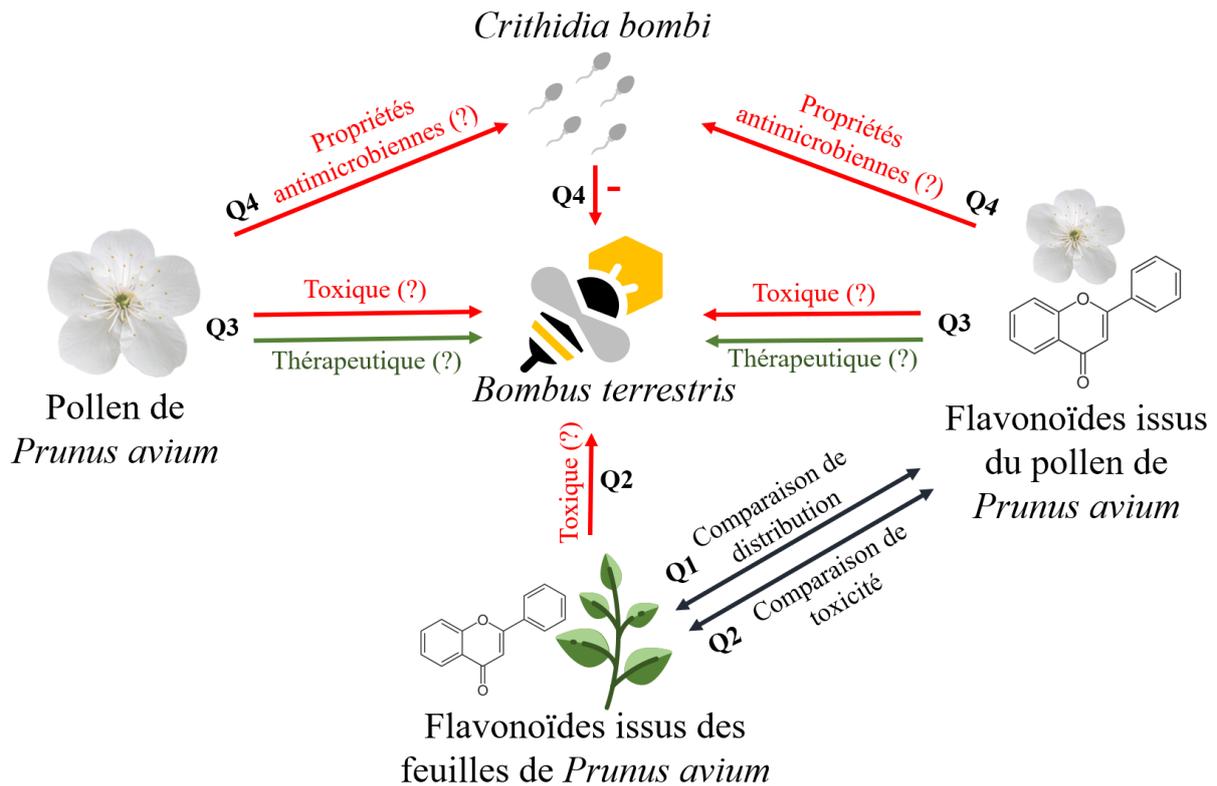


Figure 5 : Schéma des hypothèses concernant les interactions entre les différents modèles biologiques étudiés. Les flèches rouges représentent une interaction néfaste et les flèches vertes représentent une interaction bénéfique des différents facteurs envers *B. terrestris*. Les effets du pollen de merisier et de ses flavonoïdes devraient avoir des propriétés antimicrobiennes impactant négativement le parasite et impactant positivement les bourdons parasités en conséquence, mais provoquant des effets préjudiciables chez les individus sains. Les extraits issus des feuilles de merisier devraient être plus toxiques que les extraits de pollen, et avoir donc un effet néfaste pour les bourdons. La double flèche noire indique la comparaison de toxicité entre les extraits de feuilles et de pollen.

Chapitre 3 : MATERIEL & METHODES

1. Analyses phytochimiques et molécules d'intérêts

1.1. Caractérisation du profil des métabolites spécialisés et leur quantification

Dans le but de caractériser les profils chimiques des différents types de tissus du merisier, des échantillons de pollen, de nectar, de pétales et de feuilles ont été prélevés sur 5 individus distincts présents au Mons Panisel, Mons. Le nectar est en premier lieu récolté à l'aide de micro-capillaires, de manière non-invasive pour éviter le déclenchement d'une production de composés de défense. Les feuilles et les pétales sont ensuite collectés. Les étamines sont également prélevées et stockées à -20°C pour ensuite être vortexées jusqu'à en extraire le pollen.

Les feuilles et les pétales sont dans un premier tous deux broyés (Retsch® Mixer Mill MM 400), à l'inverse du pollen qui ne nécessite pas de broyage préalable. Cinquante milligrammes des échantillons ainsi obtenus sont resuspendus dans 1mL de méthanol : eau (7 : 3 v/v) avant d'être soumis à un bain à ultrasons 2 minutes à 30Hz (Retsch Mixer Mill MM 400). Le nectar est lui centrifugé 1 minute à 1000rpm avant d'être suspendu dans 200µL de méthanol : eau (7 : 3 v/v) et homogénéisés aux ultrasons. Une centrifugation (Sigma 2-16P) de 10 minutes à 4500rpm est effectuée à la suite de laquelle le surnageant est récupéré et filtré à l'aide d'une seringue filtrante de 0.2µL (Pall Acrodisc Seringue Filter avec membrane de Nylon, 13mm). Un total de 500µL de cette solution est finalement séché à 55°C pour une période de 3h et les résidus résultants sont resuspendus dans 1mL de méthanol : eau (7 : 3 v/v) avant de subir une centrifugation d'une minute à 1000rpm (Sigma 2-16P). Le surnageant (01.1-0.8mg) est resuspendu dans 200µL de solvant méthanol : eau (7 : 3 v/v).

La caractérisation du profil chimique des feuilles, pétales, pollen et nectar est réalisée par HPLC-MS, soit Chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse. La solution obtenue est prête à l'injection pour l'analyse HPLC-MS/MS. L'analyse est effectuée selon un gradient binaire à un débit de 0.25mL/min dont la phase mobile comporte 2 solvants, à savoir du méthanol et de l'eau + 0.01% d'acide formique, d'après le programme 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. Un volume de 5µL est injecté dans le spectromètre en ionisation électrospray (ESI) en mode négatif sur

une gamme de masse de 50 à 2000 Da en conditions MS particulières (annexe II.1), dont la colonne est maintenue à une température de 40°C tandis que l'échantillonneur automatique est maintenu à 20°C. Les flavonoïdes issus des feuilles, des pétales et du pollen sont extraits par une colonne Phenomenex® Kinetex C18 EVO (150 × 2,1 mm de diamètre intérieur, 100 de granulométrie), séparés par HPLC Waters™ Alliance 2695 (Waters™ Acquity UPLC H-Class pour le nectar) et analysés par un spectromètre de masse Waters™ Q-ToF US (Waters™ Synapt G2-Si pour le nectar). Des tripliquas techniques sont effectués pour les quantifications dans le but de couvrir une potentielle variabilité analytique et deux standards de quantification différents sont utilisés lors de ces analyses, à savoir la rutine pour le pollen et le nectar et la quercétine-3,4''-O-diglucoside pour les feuilles et les pétales.

1.2. Flavonoïdes

Des spectres MALDI visant le profil moléculaire du pollen et des feuilles ont été générés pour cibler la classe de métabolites à étudier. Etant donné leur différence de profil (annexe II.2), et leurs propriétés médicinales déjà largement documentée à ce jour, les flavonoïdes ont été sélectionnés comme molécules d'intérêt. Les flavonoïdes sont une classe de métabolites secondaires composés de 15 atomes de carbone formant une structure en C6-C3-C6, comportant 2 cycles aromatiques de 6 carbones liés par un pont de 3 carbones (*Fig. 6*).

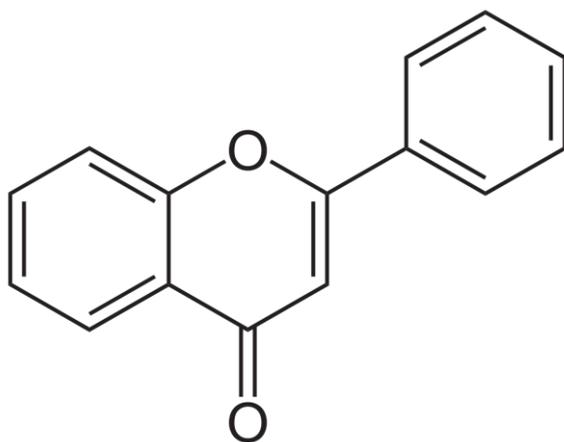


Figure 6 : Structure moléculaire des flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes provient des voies de l'acide malonique et de l'acide shikimique. A quelques rares exceptions près, seuls les plantes et les Fungi sont capables de les synthétiser (Iwashina, 2000). Les flavonoïdes sont une classe importante de métabolites étant donné que 2% du carbone photosynthétisé par les plantes sont utilisés pour leur biosynthèse

(Mancinelli, 1983). Ils interviennent dans toutes les parties de la plante. Leurs rôles sont très variés, à la fois pour médier les fonctions primaires de la plante ou pour agir comme molécule défensive : enzyme inhibitrice, système de défense contre les ultra-violets, agents chélatants pour les métaux lourds, transfert d'énergie, morphogénèse, détermination du sexe, photosynthèse ou encore régulation des hormones de croissance de la plante. Ils sont également responsables de la pigmentation des pièces florales de la majorité des espèces entomophiles et interviennent donc dans l'attraction que les pollinisateurs ont envers la ressource florale (Harborne & Grayer, 2017). Les flavonoïdes interagissent également dans les relations plantes – insectes en intervenant comme un stimulant pour les comportements d'oviposition ou comme un perturbateur nutritif en agissant comme un attractant ou un dissuasif alimentaire (Harborne, 1993). Les flavonoïdes sont également connus pour leurs vertus antioxydantes et antimicrobiennes, antiallergiques, anti-inflammatoires, anti-ostéoporotiques et éventuellement antitumorales (Rice-Evans *et al.*, 1997 ; Di Carlo *et al.*, 1999 ; Jannesar *et al.*, 2017 ; Sawicki *et al.*, 2022). (Jang *et al.*, 2012).

Chez le genre *Prunus*, 23 flavonoïdes différents ont été identifiés, sous la forme de kaempferol, quercétine et de catechine et existent sous forme de composé mono-, di- ou triglycoside monoacylé à l'acide acétique Ils sont composés des flavanols, flavones, flavanones, isoflavones, flavanols et anthocyanines. Leur biodisponibilité se situe entre 1 et 26%, et seuls les flavonoïdes aglycones sont capables d'être assimilés (Jesus *et al.*, 2020).

2. Essais biologiques

2.1. Traitements et protocole expérimental

Les effets du pollen de merisier et de ses flavonoïdes sur les bourdons parasités ou non par *Crithidia* à l'échelle individuelle et de la micro-colonie, sont testés sur un protocole expérimental croisé comportant 4 diètes différentes : (i) une diète contrôle composée de pollen de saule, (ii) une diète composée de pollen de merisier, (iii) une diète composée des flavonoïdes issus du pollen de merisier et finalement (iv) une diète composée d'extraits de feuilles de merisier. Chaque diète est testée sur 10 micro-colonies saines et 10 micro-colonies parasitées par *Crithidia*, à l'exception de la diète d'extrait de feuilles (le but étant de comparer sa toxicité aux flavonoïdes issus du pollen et non son impact sur les bourdons parasité et sur *Crithidia*), soit un total de 7 traitements et 70 micro-colonies (*Tableau 1*). Les 10 micro-colonies soumises aux différents traitements sont composées chacune de 5 ouvrières sélectionnées aléatoirement

au sein de 5 colonies mères fondatrices (issues de Biobest NV(Westerlo, Belgique)), soit 2 micro-colonies par colonie mère, d'après une adaptation du protocole de Regali & Rasmont (1995). Ce nombre d'ouvrières est choisi car précédemment utilisé par d'autres études (Moerman *et al.*, 2016, Roger *et al.*, 2017; Vanderplanck *et al.*, 2018) et est le plus favorable à la production de mâles (Gradish *et al.*, 2013). Former des micro-colonies issues de différentes colonies mères permet d'assurer une diversité génétique et d'écartier de potentiels facteurs génétiques qui pourraient créer un biais sur les résultats.

Tableau 1 : Tableau des différents traitements et des ID des micro-colonies associées.
L'indication « +P » indique les colonies parasitées par *Crithidia bombi*

Traitement	ID des micro-colonies
Traitement contrôle - Saule	AM_A1 à AM_A10
Traitement contrôle - Saule + P	AM_B1 à AM_B10
Merisier	AM_C1 à AM_C10
Merisier + P	AM_D1 à AM_D10
Saule supplémenté en flavonoïdes polliniques de merisier	AM_E1 à AM_E10
Saule supplémenté en flavonoïdes polliniques de merisier + P	AM_F1 à AM_F10
Saule supplémenté en flavonoïdes foliaires de merisier	AM_G1 à AM_G10

Les micro-colonies sont élevées en salle d'élevage de $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ à $60\% \pm 10\%$ d'humidité relative dans le noir pour une période de 35 jours clôturée par la dissection des micro-colonies. Chaque micro-colonie est hébergée dans une boîte en plastique de $10*16*16\text{cm}$ (annexe I.1.A) et nourrie *ad libitum* de candies de pollen d'une part et de sirop de sucre 65% (w/w) d'autre part (annexe I.1.B). Le sirop de sucre est contenu dans un pot et accessible aux individus par un capillaire en contact direct avec la micro-colonie. Les candies de pollen sont renouvelés tous les 2 jours pour éviter leur altération nutritive. Le pollen est administré à une dose de 1g lors des premiers jours et cette quantité est progressivement augmentée de 0.5g tout au long des 35 jours d'élevage lorsque le pollen recolleté possède une masse insuffisante dans le but de ne pas affamer les ouvrières. Une micro-colonie supplémentaire sans individu contenant un candie de pollen frais de chaque diète est également mise en place. Les candies sont pesés tous les 2 jours, de même qu'un pot de sirop, dans le but de déterminer le taux d'évaporation de chaque diète et d'ultérieurement standardiser les résultats.

2.2. Préparation des traitements

Un total de 4 diètes est testé lors de la période d'élevage, chacune préparée avec des proportions spécifiques de pollen, de sirop de sucre 65% (w/w), d'un mélange eau : éthanol 50/50, d'eau et d'extrait d'intérêt (*Tableau 2*) :

- **Une diète contrôle composée de pollen de saule** : Ce pollen est sélectionné comme contrôle pour sa qualité nutritive pour les micro-colonies de *B. terrestris* (Tasei & Aupinel, 2008; Vanderplanck *et al.*, 2018), en l'absence de l'élaboration d'une diète artificielle efficace (Gekière *et al.*, en préparation). Le pollen provient des Ruchers de Lorraine (France) et est broyé dans le but d'être homogénéisé.
- **Une diète composée de pollen de merisier** : Cette diète est composée de pollen de merisier, issu d'un mélange, isolé par tri manuel après une analyse palynologique permettant de déterminer la couleur du pollen d'intérêt. Le pollen est broyé et homogénéisé avant d'être préparé (*tableau 2*).
- **Une diète composée des flavonoïdes issus du pollen de merisier** : Une extraction Soxhlet est réalisée dans le but d'extraire les flavonoïdes issus du pollen de merisier (annexe II.3). L'extraction de 400g de pollen est effectuée à 100°C durant environ 48h. Le solvant d'extraction, ici le méthanol, cycle de manière continue à travers le filtre par évaporation et condensation. Les flavonoïdes se retrouvent dans le méthanol, évaporé par la suite à 100°C au rotavapeur (IKA RV8) afin d'obtenir des échantillons d'extraits de flavonoïdes. Ces extraits sont ensuite implémentés à une base de pollen de *Salix* (*tableau 2*). La quantité de flavonoïdes à soumettre aux individus est calculée de sorte à imiter des concentrations réalistes d'après la quantification des échantillons de la collecte fine effectuée en amont (annexe III.2)
- **Une diète composée des extraits de feuilles de merisier** : Un total de 421g de feuilles de merisier a été collecté le 23 juin 2021 sur un individu situé au niveau du Mont Panisel, Mons, et conservé dans des papillotes d'aluminium stockées dans des touries d'azote liquide avant d'être stocké à -80°C en attente d'une lyophilisation d'une durée de 48h (CHRIST® Alpha 1-2LDplus). Une fois lyophilisées, les feuilles sont broyées puis stockées à l'obscurité et préservées de l'humidité. Les feuilles broyées ont macéré dans 200mL de méthanol durant 48h à l'abri de la lumière dans le but d'en extraire les métabolites spécialisés. L'extrait obtenu est dilué et supplémenté à une base de pollen de *Salix* préalablement homogénéisé pour correspondre à des concentrations réalistes

d'après la quantification des échantillons de la collecte fine effectuée en amont (annexe III.2).

Tableau 2 : Quantité des composés (pollen, sirop, mélange eau : éthanol 50/50, eau et extrait) à mélanger pour préparer les candies de pollen des différents traitements

	Traitement contrôle - Pollen <i>Salix</i>	Pollen <i>Prunus</i>	Pollen <i>Salix</i> + extrait pollen merisier	Pollen <i>Salix</i> + extrait feuille merisier
Pollen	10 g (saule)	10 g	10 g (saule)	10 g (saule)
Sirop 65%	5 gouttes	5 gouttes	/	/
Eau : Ethanol 50/50	0.5 mL	0.5 mL	/	/
Eau	4 mL	3.5 mL	/	/
Extrait	/	/	4.5 mL	4.6 mL

3. Mise en place de réservoirs parasitaires et inoculation

Les colonies « stock » permettant l'inoculation des micro-colonies à parasiter ont été formées l'an dernier dans le cadre des mémoires de d'Antoine Gekière (2021) et Martin Bégou (2021). Des reines infestées par *Crithidia* ont été capturées et ont permis d'implémenter des colonies réservoirs, entretenues jusqu'alors et ayant subi 7 cycles d'inoculation jusqu'à aujourd'hui.

Les inoculi de *Crithidia* sont réalisés en collectant des fèces d'une trentaine d'ouvrières infestées issues de deux colonies « stock ». Les fèces sont ensuite diluées avec une solution saline (0.9% NaCl) pour obtenir un volume final de 1mL avant d'être soumises à une série de 8 centrifugations différentielles (annexe III.1) qui permettent de purifier le parasite (méthode développée par Cole (1970) et adaptée par Baron *et al.* (2014) et Martin *et al.* (2018)). Quelques μL de la solution obtenue sont introduits dans une chambre de Neubauer (annexe I.2) et le nombre de cellules de *Crithidia* est compté en microscopie à contraste de phase à grossissement 400x (Eclipse Ts2R, Nikon; Tokyo, Japan). La solution riche en parasites est ensuite mélangée avec une solution à du sucre 40% (w/w) pour ajuster la solution à une concentration de 2500 cellules/ μL . Un volume total de 10 μL , soit 25 000 cellules, est administré oralement par via un embout de seringue aux ouvrières à inoculer individuellement isolées dans une des cages Nicot® (annexe I.1.C). Les ouvrières sont au préalable affamées durant une période de 5h pour

assurer la bonne prise de l'inoculum. Seules les ouvrières ayant consommé l'entièreté des 10 μ L sont introduites dans les micro-colonies et utilisées pour l'expérience.

4. Paramètres mesurés

4.1. Dynamique de collecte, réponses de stress et développement des micro-colonies

Lors de la phase d'expérimentation, un relevé de la masse du candie de pollen et du pot de sirop de sucre est effectué tous les deux jours dans le but de déterminer la quantité collectée par les individus et de suivre la dynamique de collecte tout au long des 35 jours d'élevage. De plus, deux paramètres sont calculés à partir de ces données : (i) l'efficacité pollinique (masse du couvain/consommation totale de pollen (g)) et (ii) la dilution pollinique (consommation totale de sirop/consommation totale de pollen), des réponses de stress reflétant tous deux la qualité de la diète testée. Plus l'efficacité pollinique est importante, plus la diète testée est qualitativement nutritive. A l'inverse, les comportements de dilution pollinique permettent une dilution du pollen dans le but d'en diminuer la toxicité. Plus la dilution pollinique est élevée et plus la diète possède une certaine toxicité (Berenbaum & Johnson, 2015). D'autres réponses de stress sont également évaluées, telles que l'éjection larvaire et la mortalité des ouvrières, en dénombrant les larves éjectées et leur jour d'éjection d'une part et en relevant et pesant les ouvrières mortes d'autre part. En effet, sous certains facteurs de stress, les ouvrières tendent à éjecter les larves en cours de développement, faisant de l'éjection larvaire un paramètre intéressant pour évaluer le stress auquel les micro-colonies sont soumises (e.g. Pomeroy & Plowright, 1979 ; Fisher & Pomeroy, 1989). Un relevé de l'émergence des mâles est également effectué.

A la fin de la période d'élevage, chaque micro-colonie est disséquée et les différents stades de développement que composent la micro-colonie sont analysés (*Fig. 7*). Les larves isolées pré-défécation, les larves isolées post-défécation, les pupes, les mâles non-émergés et les mâles émergés sont dénombrés et pesés à l'aide d'une balance analytique. Chaque individu est pesé individuellement, à l'exception des larves non-isolées pesées en lot. Les œufs quant à eux sont uniquement dénombrés. Pour chaque micro-colonie, la collecte des ressources ainsi que les masses produites au sein de chacun des stades de développement est divisée par la masse totale des ouvrières pondérée par le temps passé par chacune des ouvrières au sein de la micro-

colonie en cas de remplacement. Cette standardisation permet de prendre en compte les éventuels biais « d'investissement différentiel » des ouvrières au sein des micro-colonies.



Figure 7 : Photos des différents stades de développement du bourdon, à savoir 1. Les œufs, 2. Les larves non-isolées, 3. Les larves isolées pré-défécation, 4. Les larves isolées post-défécation, 5. Les pupes et leurs différents stades de développement et finalement 6. Les mâles non-émergés avant que l'individu n'atteigne 7. Le stade adulte. Crédits de photographie : Paolo Rosa.

4.2. Charge parasitaire

Les fèces d'une ouvrière par micro-colonie sont prélevées aux jours 4, 6, 8, 12, 16, 20 et 35 de l'élevage dans le but d'en déterminer la charge parasitaire, en comptant le jour 1 comme correspondant au jour d'inoculation (*Fig. 8*).

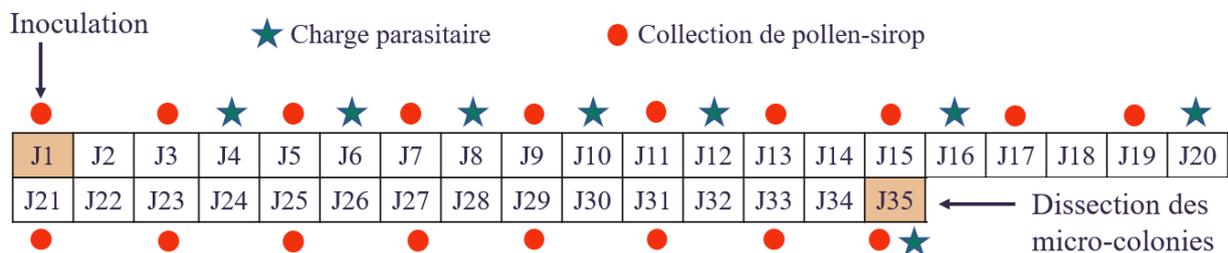


Figure 8 : Aperçu de la fréquence des relevés durant la phase d'élevage concernant la collecte et pesée des candies de pollen et du sirop d'une part et de la charge parasitaire d'autre part. Le sirop et les candies de pollen sont relevés tous les 2 jours (points rouges) tandis que la charge parasitaire est relevée les jours 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 et 35 (étoiles vertes).

Une ouvrière de chaque micro-colonie parasitée est aléatoirement sélectionnée et taguée dans le but de subir les prélèvements de fèces pour les 35 jours d'expérimentation. Les ouvrières taguées sont isolées individuellement dans un Falcon® de 50mL pour une période de 90 minutes au cours de laquelle les fèces sont collectées à l'aide de capillaires gradués de 10µL. Le volume total déféqué est ainsi déterminé. Une ouvrière aléatoirement sélectionnée par micro-colonie non parasitées est également soumise à cette isolation pour soumettre les ouvrières de chaque traitement à un stress similaire et vérifier qu'aucune contamination ne s'est produite depuis les colonies parasitées vers les colonies saines. Sept µL des fèces collectées sont ensuite introduits dans une chambre de Neubauer et observés à l'aide d'un microscope à contraste de phase en phase 2 et à un grossissement 400x (Eclipse Ts2R, Nikon; Tokyo, Japan). Les cellules de *Crithidia* sont dénombrées dans le but de déterminer la charge parasitaire. Les fèces sont éventuellement diluées (2, 5 ou 10x selon les besoins) à la solution saline (0,9% NaCl) si nécessaire.

4.3. Corps gras

Les corps gras représentent non seulement un organe de stockage énergétique important (Arrese and Soulages, 2010) mais également un organe dont le rôle est primordial dans la mise en place de réponses immunes chez les insectes, étant le site de synthèse d'immuno-protéines tels que les peptides anti-microbiens (e.g. Zachary & Hoffman, 1984). Malgré le fait qu'aucune étude n'ait encore clairement démontré la potentielle corrélation entre la masse des corps gras et la réponse immune, l'hypothèse qu'un corps gras développé fournit de l'énergie et contribue directement aux réponses immunes est probable. L'analyse des corps gras est donc utilisée comme mesure de l'immunocompétence des individus (Hetru *et al.*, 1998) et permet donc dans notre cas de déterminer les effets des différents traitements à l'échelle individuelle.

Les corps gras de 2 mâles et 2 ouvrières par micro-colonie sont analysés selon Ellers (1996). Dans le cas où une micro-colonie n'aurait pas ou pas suffisamment produit de mâles émergés, un mâle d'une autre micro-colonie issue d'une même colonie mère est sélectionné en remplacement. Les abdomens de chaque individu sont isolés et pesés. Après un séchage à l'étuve à 70°C d'une durée de 72h, les abdomens sont à nouveau pesés pour ensuite être immergés dans 2mL de diéthyl-éther, qui permet la dissolution des corps gras. Les abdomens sont égouttés et rincés une seconde fois au diéthyl-éther 24h après. Une seconde période de séchage à 70°C d'une durée de 7 jours est effectuée avant de peser les abdomens secs. La

proportion de masse des corps gras est finalement déterminée par la perte de masse suite à la dissolution des corps gras, standardisée par la masse de l'abdomen sèche avant extraction.

5. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées avec la version 4.0.5 de R et l'entièreté des graphiques ont été générés par le package ggplot2.

5.1. Analyses phytochimiques

Afin d'analyser la quantité de flavonoïdes au sein des différents tissus préalablement analysés, un test non-paramétrique de Kuruskal-Wallis (fonction `kruskal.test`, package `stats`) est effectué, ainsi qu'un test post-hoc de Wilcoxon (fonction `pairwise.wilcox.test`, package `stats`) lorsque les résultats du test sont significatifs. Pour analyser les différences de profils en flavonoïdes, une analyse multivariée des variances par permutation (perMANOVA) est ensuite effectuée sur les quantités relatives de chacun des composés détectés en utilisant une matrice de distance euclidienne et 999 permutations (fonction `adonis`, package `vegan`). Dans le cas d'une différence significative détectée, des comparaisons paire par paire sont effectuées avec ajustement de la p-value (fonction `pairwise.adonis`, package `vegan`). Les données sont visualisées à l'aide d'une analyse en composantes principales, ou ACP (fonction `PCA`, package `FactoMineR`).

5.2. Effets dommageables des flavonoïdes sur les bourdons sains

Des modèles linéaires généralisés à effets mixtes (fonctions `glmer` ou `glmmTMB`, packages `lme4` ou `glmmTMB`) ont été calculés afin de comparer les effets de la diète contrôle (saule), de la diète naturelle (merisier) et des diètes supplémentées en extraits foliaire et pollinique sur bourdons sains (aucune modalité parasitée n'est incluse dans les analyses), avec comme facteur fixe la diète et comme facteur aléatoire la colonie mère, ou la micro-colonie imbriquée dans la colonie mère si nécessaire. Lorsque les résultats des différents modèles sont significatifs, un test post-hoc à comparaison « pairwise » (fonction `emmeans`, package `emmeans`) est réalisé.

Pour les données quantitatives continues (masses), lorsque la distribution des résidus suit une loi normale (fonction `Shapiro.test`, package `stats`), une distribution gaussienne est utilisée (LMM ; fonction `lmer`, package `lme4`) (i.e. collecte de sirop). Si la condition de normalité des

résidus n'est pas respectée (i.e. analyse des masses des différents stades de développement produit par les micro-colonies, dilution pollinique et efficacité pollinique). Pour le modèle ajusté aux corps gras, le sexe de l'individu est également injecté comme facteur fixe au sein du modèle et certaines valeurs aberrantes sont exclues du modèle. Pour les données quantitatives continues bivariées (i.e. éjection des larves), une distribution binomiale (argument family = binomiale) est sélectionnée.

Pour les données quantitatives discrètes (dénombrement), lorsque la distribution des résidus ne présente pas de sur dispersion ni d'excès de valeurs nulles (fonctions testDispersion et TestZeroInflation, package DHARMA), une distribution de Poisson est utilisée (i.e. nombre d'individus par stade de développement). Lorsque l'excès de zéros ne peut être contrôlé par un modèle zéro-inflaté, une distribution de type binomiale négative est utilisée.

Une distribution binomiale est utilisée pour l'analyse de l'éjection larvaire tandis qu'une binomiale négative est préférée pour l'analyse du nombre d'individus produits pour l'ensemble des stades de développement donné que les résidus sont surdispersés avec l'utilisation d'une distribution de Poisson. Finalement, une distribution gamma est choisie pour l'analyse de la masse totale des différents stades de développement, la collecte de sirop et de pollen ainsi que pour l'analyse de la dilution et de l'efficacité pollinique. De plus, une distribution gamma ainsi que la fonction link = « logit » est utilisée pour l'analyse des corps gras, avec comme facteurs fixes la diète et le sexe et comme facteur aléatoire la colonie et la micro-colonie.

Finalement, pour analyser les effets de la diète sur la mortalité des ouvrières au sein des micro-colonies, une courbe de survie Kaplan-Meier (fonction ggsurvplot, package survival) ainsi qu'une analyse de régression (fonction coxme, package survival) sont réalisés pour vérifier la significativité du taux de mortalité des ouvrières par rapport au traitement, avec comme facteur fixe la diète et comme facteur aléatoire la micro-colonie. Certaines ouvrières mortes pour des raisons accidentelles (individus écrasés, mauvais accès au sirop) n'ont pas été prises en compte pour cette analyse pour ne pas fausser les résultats. Finalement, un test post-hoc à comparaison « pairwise » est effectué (fonction pairwise_survdiff, package survminer)

5.3. Effets du parasite et effets thérapeutiques des flavonoïdes sur les bourdons parasités

Des modèles linéaires généralisés à effets mixtes (fonctions `glmer` ou `glmmTMB`, packages `lme4` ou `glmmTMB`) ont été calculés afin d'établir les effets du parasite et de comparer les effets de la diète contrôle (saule), de la diète naturelle (merisier) et de la diète supplémentée en extrait pollinique sur bourdons parasités (seule la modalité sur diète supplémentée en extrait foliaire n'est pas incluse dans les analyses), avec comme facteurs fixes croisés la diète et le parasite, et comme facteur aléatoire la colonie mère, ou la micro-colonie imbriquée dans la colonie mère si nécessaire. Lorsque les résultats des différents modèles sont significatifs, un test post-hoc à comparaison multiples paire par paire (fonction `emmeans`, package `emmeans`) est réalisé.

Les mêmes modèles et arguments ont été utilisés pour analyser la collecte de ressources, le nombre et la masse des différents stades de développement, l'éjection larvaire, le taux de mortalité des ouvrières, l'efficacité pollinique, la dilution pollinique et les corps gras, à la différence que seules les diètes parasitées ont été analysés, à savoir les diètes de saule, de merisier et de flavonoïdes issus du pollen de merisier parasités. Les facteurs fixes sont désignés comme étant la diète, le parasite et leur interaction.

La masse totale standardisée de pollen collecté a été analysée à l'aide d'une LMM (distribution gaussienne). La charge parasitaire est quant à elle analysée par GLMM (fonction `glmmTMB`, package `glmmTMB`) avec l'interaction du jour et de la diète comme facteurs fixes et la colonie comme facteur aléatoire. Une distribution binomiale négative (`family = nbinom2`) est utilisée avec la fonction `link = log` et la fonction `ziformula = ~day` (test de « zero-inflation » non-satisfait pour une distribution poisson).

Chapitre 4 : RESULTATS

1. Les flavonoïdes du merisier : parties végétatives et ressources florales

La quantité en flavonoïdes est significativement différente selon le tissu considéré (Kruskal-Wallis, $\chi^2 = 11,411$, $df = 3$, $p = 0,0097$). Un test de Wilcoxon permet d'affirmer que le pollen est le tissu floral qui comporte le plus haut taux de flavonoïdes, en comparaison avec les feuilles, les corolles et le nectar, possédant un taux de flavonoïde similaire les uns par rapport aux autres (Fig. 9 & annexe IV.1).

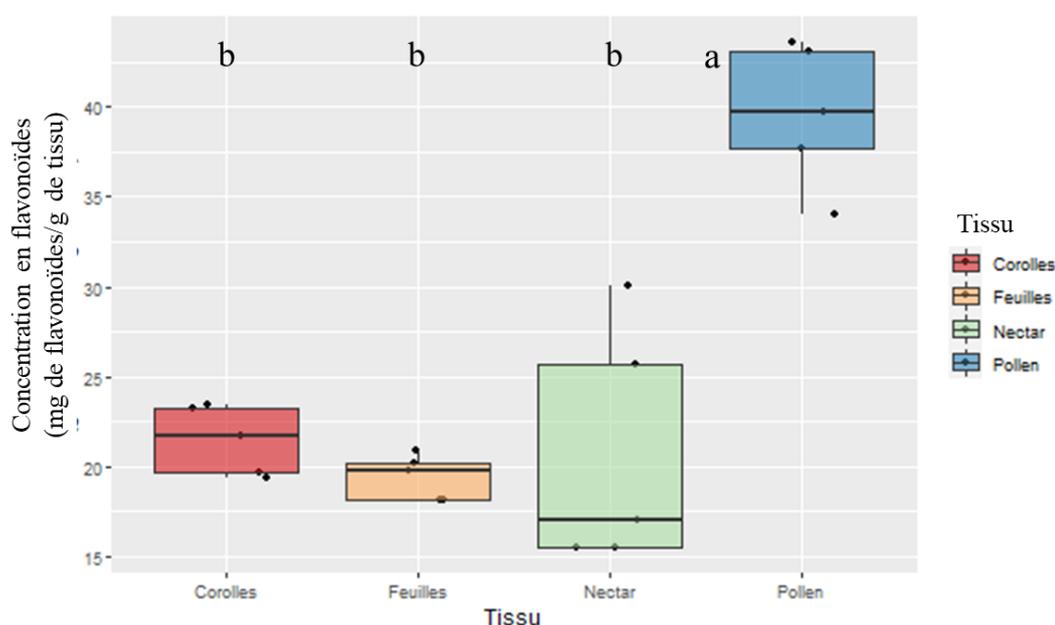


Figure 9 : Concentrations des flavonoïdes (mg de flavonoïdes/g de tissu) au sein des corolles, des feuilles, du nectar et du pollen. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

En ce qui concerne la composition en flavonoïdes, un total de 9 composés ont été décelés, et seuls 8 d'entre ont été identifiés (annexe IV.2). Des composés appartenant à d'autres classes de métabolites ont également été identifiés (annexe IV.3). Les analyses indiquent que le profil en flavonoïdes diffère significativement entre les différents tissus ($F = 74,442$; $p < 0,001$; $R^2 = 0,93315$) (Fig. 10).

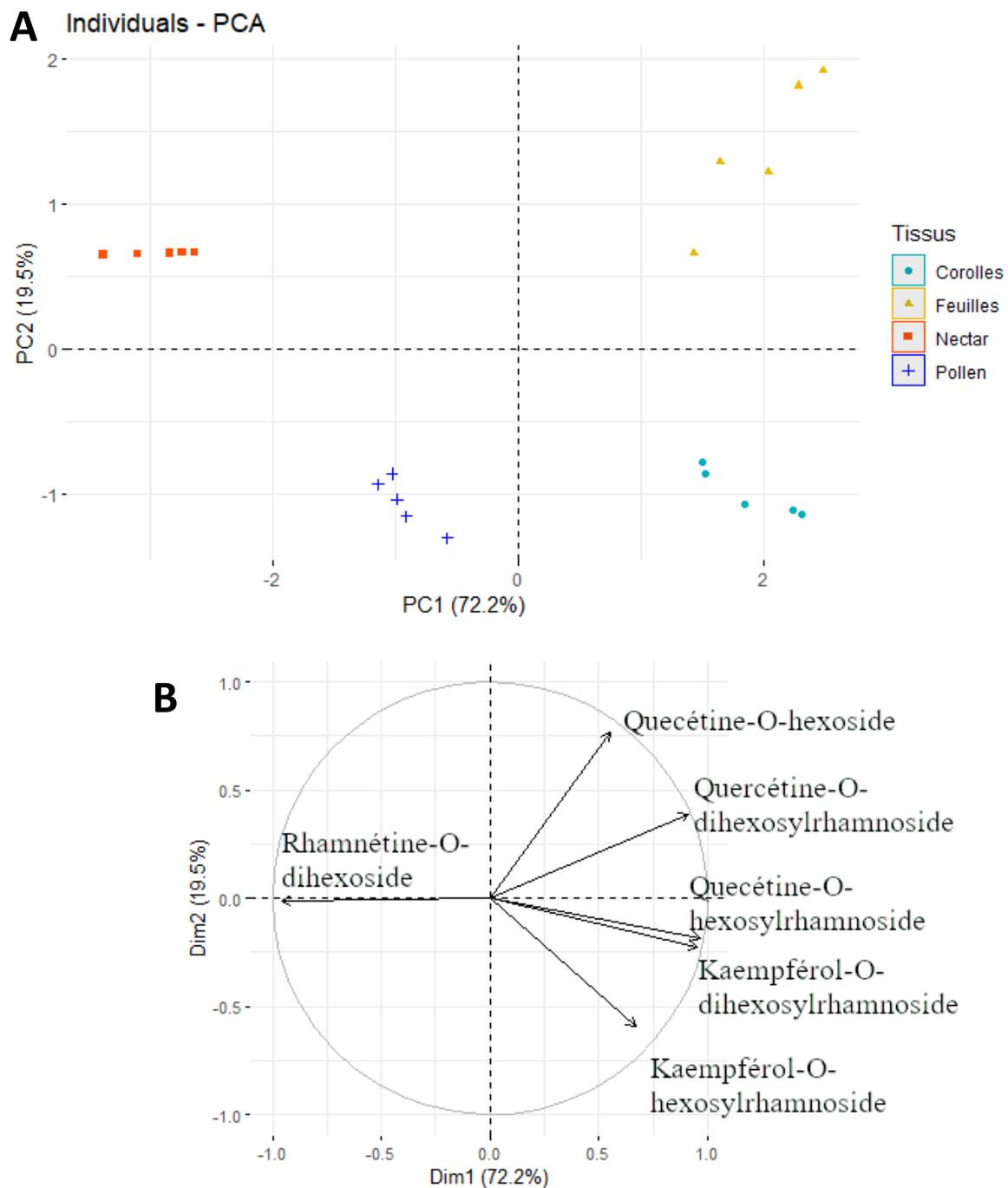


Figure 10 : Ordination des flavonoïdes présents au sein des différents tissus de merisier via une analyse de composantes principales (ACP). A. Le premier axe représentant 72.2% de la variance et le second axe représentant 19.5% de la variance, un total de 91.7% de la variance est couvert par l'ACP. Les tissus forment 4 groupes distincts selon leur composition et concentration pour les différents composés. **B.** Représentation dans l'espace des variables dans un cercle de corrélation.

2. Toxicité de la diète sur les bourdons sains

Collecte des ressources – La collecte de pollen diffère significativement au sein des micro-colonies nourries avec les différentes diètes ($\chi^2 = 20,814$, $df = 3$, $p < 0,001$), les micro-colonies nourries au pollen de saule collectant plus de pollen que celles nourries au saule supplémenté en flavonoïdes foliaires. Les micro-colonies nourries au pollen de merisier collectent également significativement plus de pollen que celles nourries sur les diètes supplémentées en extraits foliaire et pollinique. La collecte de sirop diffère également significativement en fonction de la diète fournie aux micro-colonies. ($\chi^2 = 13,212$, $df = 3$, $p = 0,0042$). En effet, la collecte de sirop pour les micro-colonies nourries au pollen de merisier est significativement plus importante que chez les micro-colonies nourries au pollen de saule et significativement moins importante en comparaison aux micro-colonies nourries à la diète supplémentée de flavonoïdes polliniques.

Développement des micro-colonies : Chaque micro-colonie a produit les différents stades de développement, à savoir les œufs, les larves non-isolées, les larves isolées pré-défécation, les larves isolées post-défécation, les pupes, les mâles non-émergés et les mâles émergés. Les analyses indiquent que les micro-colonies ne présentaient pas la même dynamique de développement selon la diète fournie ($\chi^2 = 177,46$, $df = 3$, $p < 0,001$) à l'exception des micro-colonies nourries au pollen de saule et au pollen de saule supplémenté en extrait pollinique qui ont produit une quantité similaire d'individus au sein des différents stades du couvain (*Fig. 11.A*). De manière plus détaillée, les micro-colonies nourries au pollen de merisier ont produit un nombre significativement supérieur d'œufs que les micro-colonies nourries au pollen de saule ($\chi^2 = 9,8401$, $df = 2$, $p = 0,007299$). Ce nombre produit d'œufs ne diffère cependant pas entre les micro-colonies soumises à la diète supplémentée en flavonoïdes et les micro-colonies nourries au pollen de saule et de merisier. En ce qui concerne le nombre de larves non-isolées, il est significativement différent entre chaque diète, à l'exception du pollen de saule et de la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques qui ont donc produit une quantité semblable de larves non-isolées ($\chi^2 = 49,438$, $df = 3$, $p < 0,001$). Le nombre de larves isolées pré-défécation produit est significativement plus élevé dans les micro-colonies nourries au pollen de merisier par rapport aux micro-colonies nourries aux diètes supplémentées en flavonoïdes polliniques et foliaires ($\chi^2 = 12,403$, $df = 3$, $p = 0,006119$) alors que les larves post-défécation sont significativement moins nombreuses pour les micro-colonies nourries aux diètes supplémentées en flavonoïdes polliniques et foliaires en comparaison aux micro-colonies nourries au pollen de merisier et de saule ($\chi^2 = 20,83$, $df = 3$, $p < 0,001$).

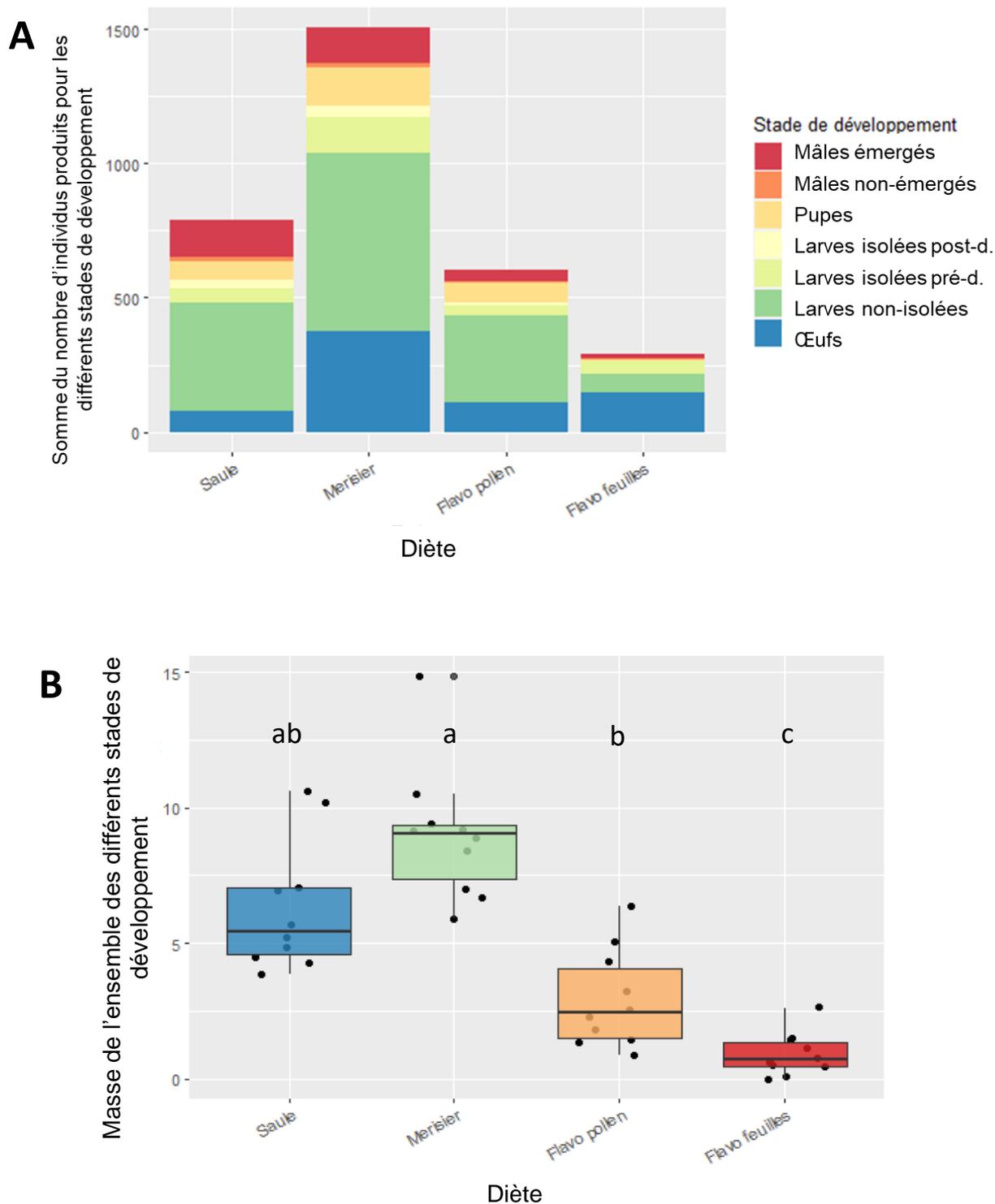


Figure 11 : A. Graphique de la somme des individus produits par l'ensemble des micro-colonies du traitement et B. Graphique de la masse standardisée totale d'individus produit par les micro-colonies tout stades de développement confondu en fonction de la diète. « Larves isolées pré-d. » et « Larves isolées post-d. » indiquent ici les larves isolées pré-défécation et les larves isolées post-défécation, respectivement. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

Les micro-colonies nourries au pollen de saule nourries au pollen de merisier ont produit significativement plus de pupes que les micro-colonies soumises à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques et au pollen de saule ($\chi^2 = 76,103$, $df = 3$, $p < 0,001$). Les micro-colonies soumises à la diète supplémentée en flavonoïdes foliaires produisent quant à elles significativement moins de pupes que les micro-colonies soumises aux autres diètes. Ce même résultat est également observé pour la production de mâles émergés ($\chi^2 = 61,838$, $df = 3$, $p < 0,001$). Les micro-colonies nourries au pollen de saule et de merisier ont en revanche produit un nombre similaire de mâles, qui est significativement supérieur au nombre de mâles produits par les micro-colonie soumises à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques.

Finalement, la diète $\chi^2 = 101,9$, $df = 3$, $p < 0,001$) a un effet significatif sur la masse des différents stades de développement produits par la micro-colonie (*Fig. 11.B & annexe IV.4*). Les micro-colonies pour lesquelles du pollen de merisier a été fourni ont produit des individus significativement plus lourds que les micro-colonies soumises aux autres diètes. Les micro-colonies nourries aux diètes supplémentées en flavonoïdes foliaires et polliniques ont quant à elles produit des individus dont la masse est similaire, significativement inférieure à la masse des individus produits par les micro-colonies nourries aux pollens de saule et de merisier.

Réponses de stress : Les analyses révèlent que selon la diète fournie, les micro-colonies ont un comportement de dilution du pollen significativement différent (*Fig. 12*), les micro-colonies nourries au pollen de merisier diluant significativement moins le pollen collecté que celles nourries sur les autres diètes ($\chi^2 = 12,562$, $df = 3$, $p = 0,005686$). De même, l'efficacité pollinique diffère significativement au sein des micro-colonies selon la diète fournie, l'efficacité pollinique étant significativement moins efficace au sein des micro-colonies nourries au pollen de saule supplémenté en extrait foliaire en comparaison des 3 autres diètes ($\chi^2 = 46,986$, $df = 3$, $p < 0,001$). Une différence significative est également détectée entre les micro-colonie nourrie au pollen de saule supplémenté en extrait pollinique comparé à celles nourries au pollen de saule, l'efficacité pollinique étant plus élevées dans les dernières.

En ce qui concerne les paramètres d'éjection larvaire et de mortalité des ouvrières, les micro-colonies nourries au pollen de saule supplémenté en extrait foliaire ont éjectés significativement plus de larves comparées aux micro-colonies nourries aux autres diètes ($\chi^2 = 263,03$, $df = 3$, $p < 0,001$) (*Fig. 13*). La diète n'a quant à elle aucun impact significatif sur la mortalité des ouvrières ($\chi^2 = 7,116$, $df = 3$, $p = 0,06829$).

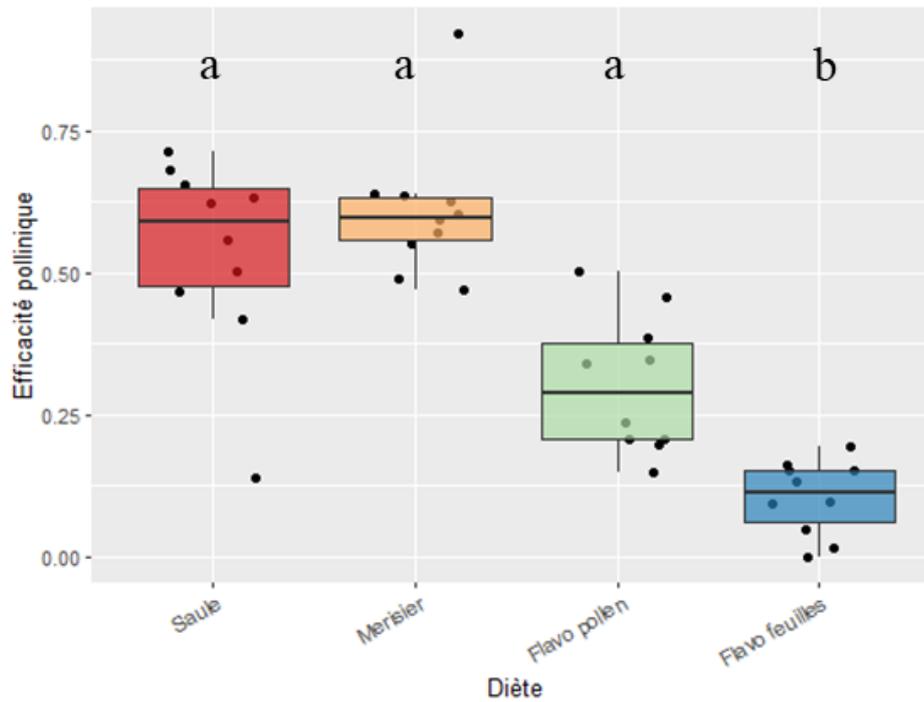


Figure 12 : Efficacité pollinique des différentes diètes. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

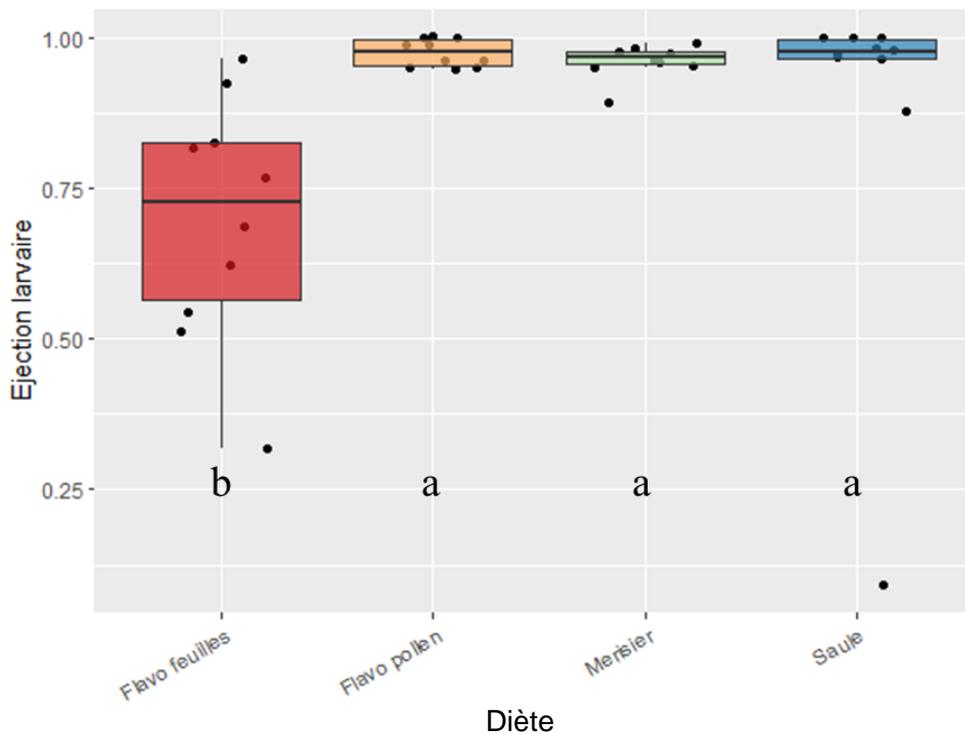


Figure 13 : Impact de la présence du parasite sur l'éjection larvaire. L'éjection larvaire est calculée par la différence entre le nombre total d'individus produit par la micro-colonie, tout stade confondu additionnés au nombre de larves éjectées, et du nombre de larves éjectées, le tout standardisé le nombre total d'individus produits. Plus l'éjection tend vers 1, moins il y a eu de larves éjectées et plus l'éjection larvaire tend vers 0, plus le nombre de larves éjectées est important.

Corps gras : Les corps gras des individus nourris aux pollen de saule, de merisier et de flavonoïdes foliaires ne voient pas leur masse être significativement impactée par la diète dont ils se nourrissent ($\chi^2 = 15,5359$, $df = 3$, $p = 0,001411$). En revanche, les corps gras des individus nourris à la diète supplémentée en flavonoïdes issus du pollen de merisier sont significativement plus développés que les corps gras des individus nourris aux trois autres diètes (*Fig. 14*).

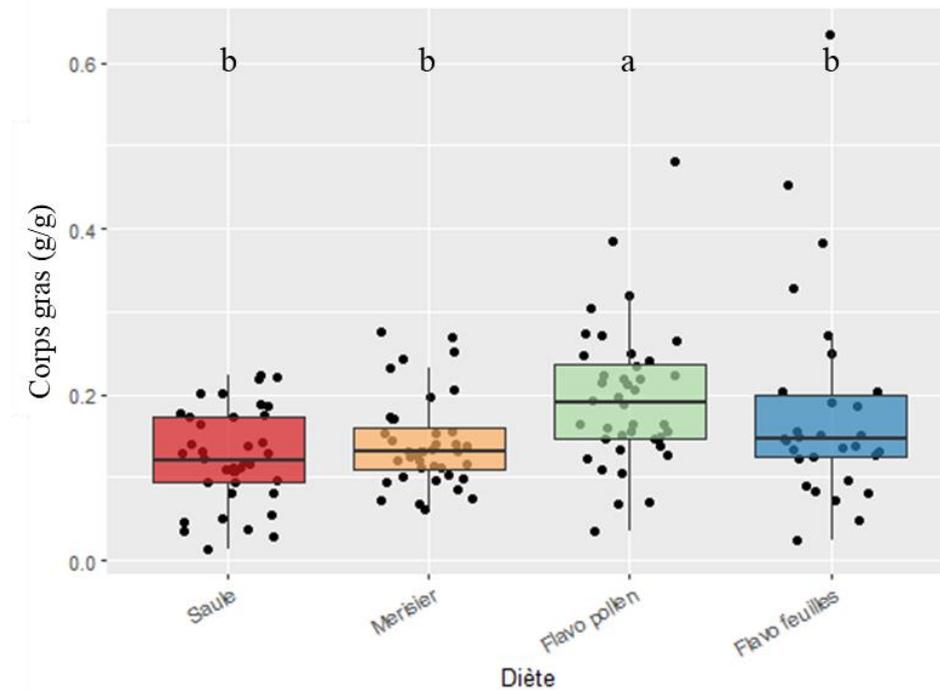


Figure 14 : Impact de la diète sur masse standardisée des corps gras en fonction des différentes diètes au sein des micro-colonies. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

3. Effets du parasite et effets thérapeutiques des flavonoïdes sur les bourdons parasités

Collecte des ressources : Ni la collecte de pollen (Parasite, $\chi^2 = 0,3959$, $df = 1$, $p = 0,5292$) ni la collecte de sirop (Parasite, $\chi^2 = 0,000$, $df = 1$, $p = 0,9989$) ne sont impactés par la présence du parasite.

Développement des micro-colonies : Les analyses révèlent que le nombre d'individus produits pour l'ensemble des différents stades de développement n'est pas significativement impacté par la présence du parasite (*Fig. 15*) (Parasite, $\chi^2 = 0,9722$, $df = 1$, $p = 0,3241$). L'infection n'impacte globalement pas de manière significative le nombre d'individus produit pour les œufs (Parasite, $\chi^2 = 0,1199$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,729155$), les larves non-isolées (Parasite, $\chi^2 = 2,5175$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,2440$), les larves isolées pré-défécation (Parasite, $\chi^2 = 3,5821$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,1668$), les larves isolées post-défécation (Parasite, $\chi^2 = 3,8821$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,14356$), les pupes (Parasite, $\chi^2 = 3,8821$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,14356$) ainsi que les mâles non-émergés (Parasite, $\chi^2 = 0,1064$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,7443$). La présence de *Crithidia* provoque cependant la production d'un nombre significativement inférieur de mâles émergés (Parasite*Diète, $\chi^2 = 7,6446$, $df = 2$, $p = 0,021877$), les micro-colonies parasitées en ayant moins produit que les micro-colonies saines pour les micro-colonies nourries au pollen de saule et de merisier (*Fig. 16*). Finalement, la présence du parasite n'affecte pas masse totale des individus produits, tout stade de développement confondu (Parasite, $\chi^2 = 0,3639$, $df = 2$, $p = 0,5464$).

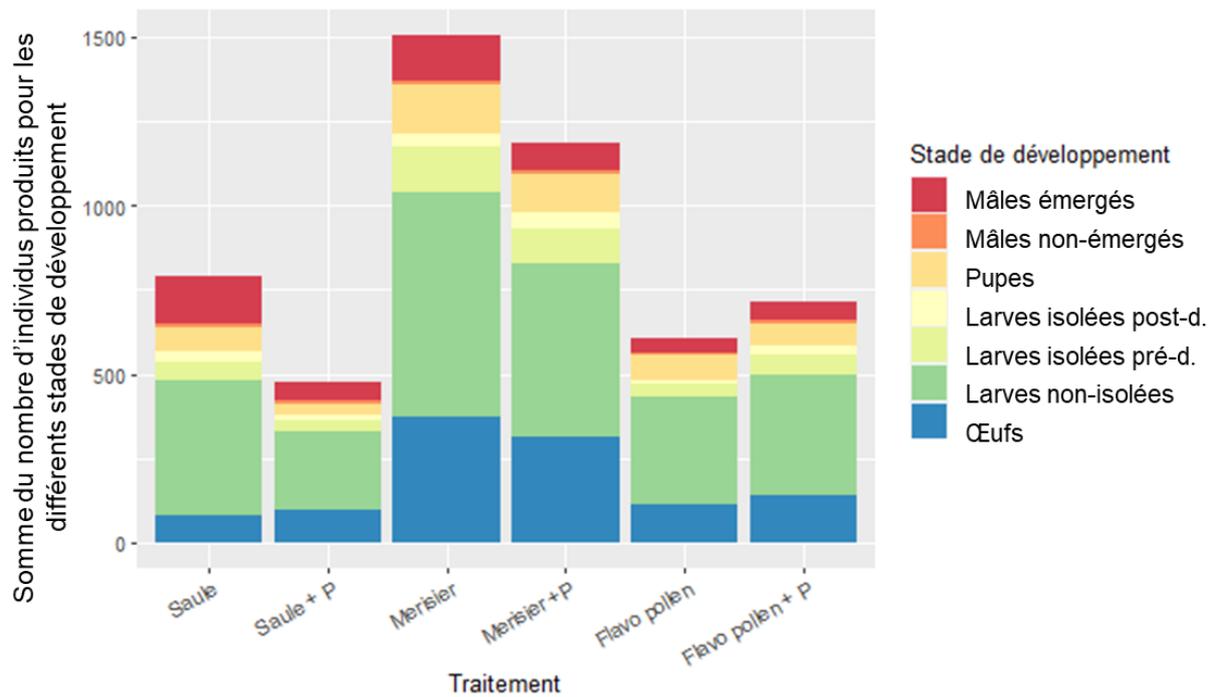


Figure 15 : Impact de la présence de *Crithidia* sur le nombre total d'individus produit. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

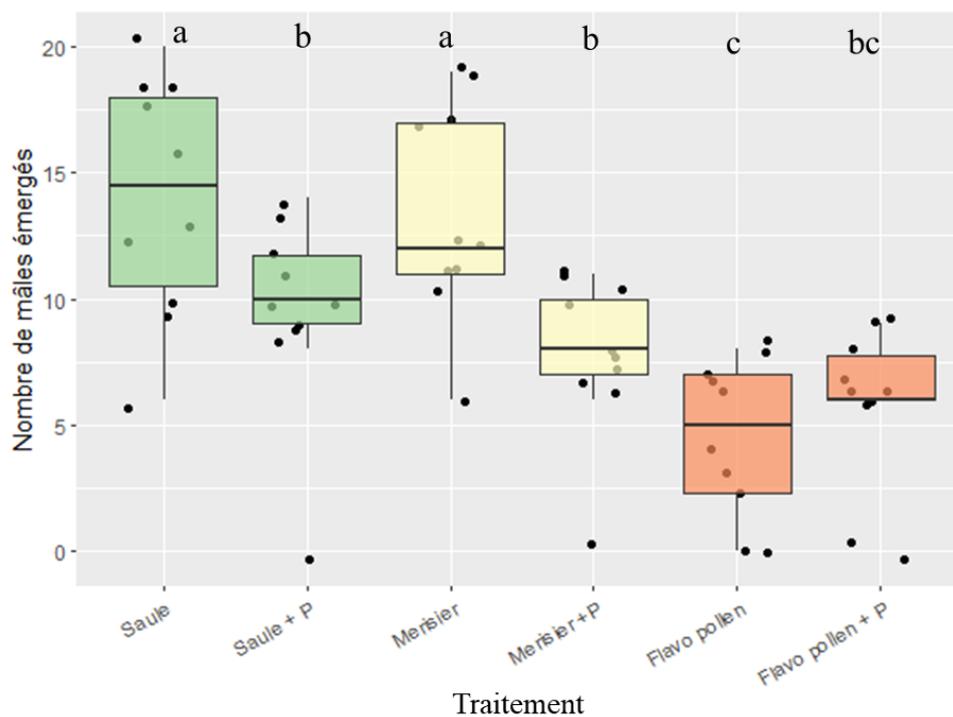


Figure 16 : Impact de la présence de *Crithidia* sur le nombre de mâles émergés produit. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

Réponses de stress : Aucun effet significatif du parasite n'a été détecté sur le comportement de dilution du pollen, hormis au sein des micro-colonies nourries au pollen de saule supplémenté en extrait pollinique où la présence du parasite diminue significativement le comportement de dilution du pollen (Parasite*Diète ; $\chi^2 = 18,7159$, $df = 2$, $p < 0,001$) (Fig. 17). L'efficacité pollinique n'est quant à elle pas significativement impactée par la présence de *Crithidia* (Parasite*Diète ; $\chi^2 = 4,7324$, $df = 2$, $p = 0,09384$).

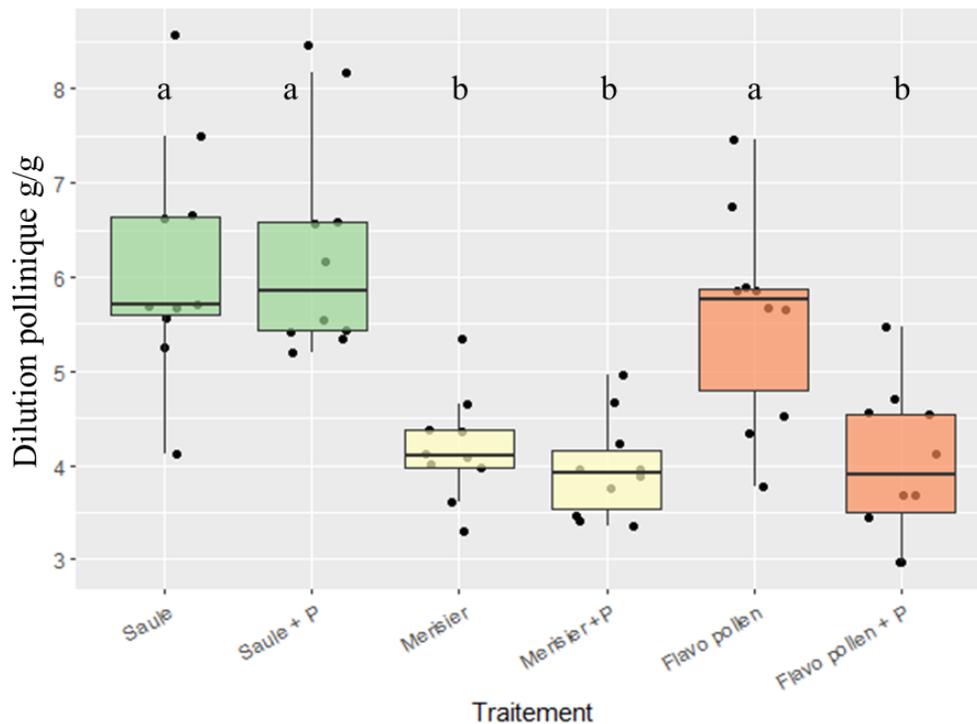


Figure 17 : Impact de la présence de *Crithidia* sur la dilution pollinique des différentes diètes. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

En ce qui concerne les paramètres d'éjection larvaire et de mortalité des ouvrières, les micro-colonies parasitées n'ont pas éjecté significativement plus de larves comparées aux micro-colonies non parasitées (Parasite, $\chi^2 = 0,0547$, $df = 1$, $p = 0,8134$). La mortalité des ouvrières est quant à elle impactée par la diète (Diète, $\chi^2 = 6,3056$, $df = 1$, $p = 0,012036$) ainsi que la présence du parasite (Parasite, $\chi^2 = 12,6671$, $df = 2$, $p = 0,001776$). L'infection réduit significativement le taux de survie des individus.

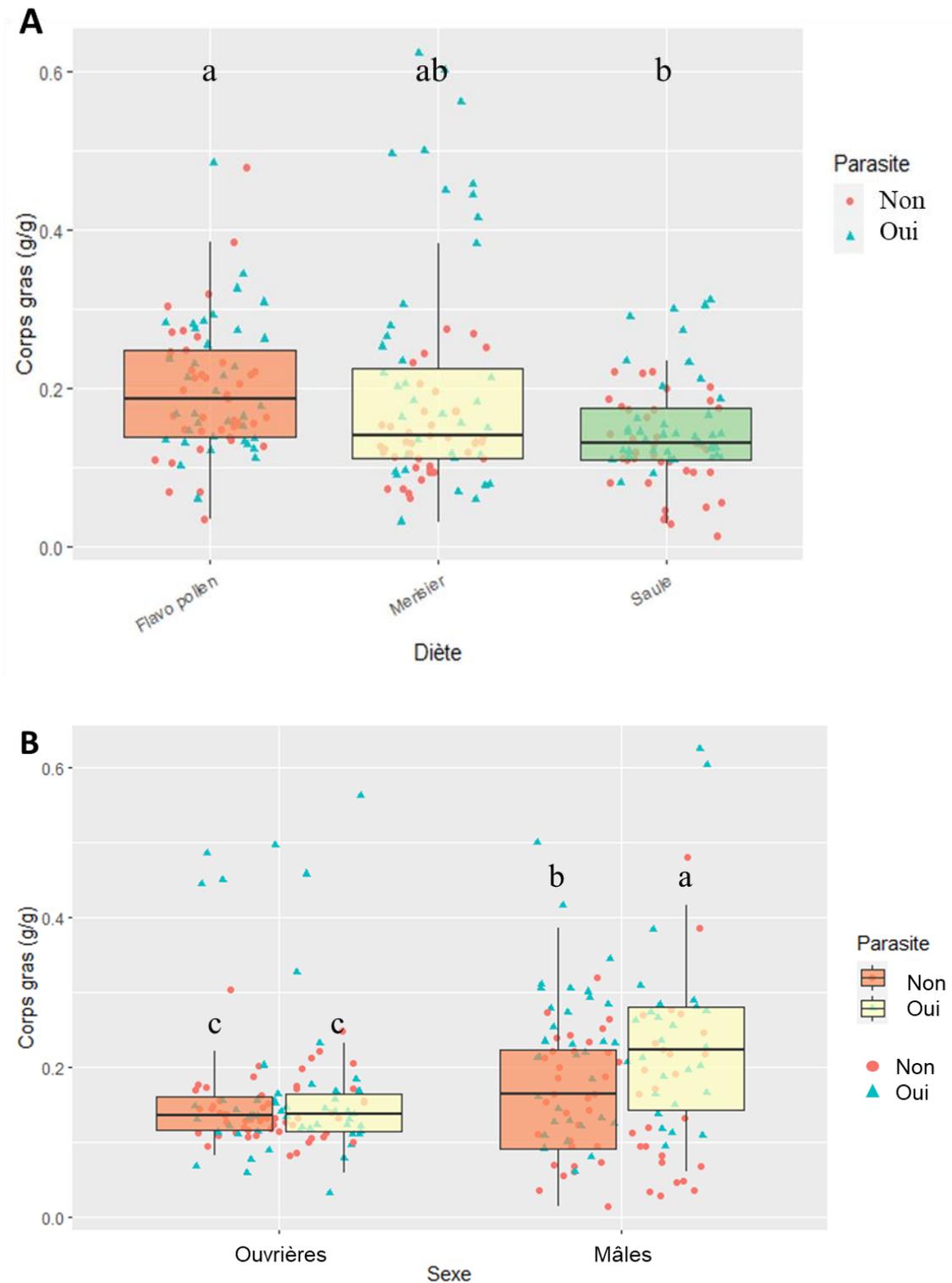


Figure 18 : A. Développement des corps gras en fonction de la diète et B. Développement des corps gras des individus mâles et femelles exposés à *Crithidia*. Les individus parasités sont représentés par un triangle bleu tandis que les individus sains sont représentés par un cercle rouge. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.

Corps gras : Un effet significatif de la diète ($\chi^2 = 13.0831$, $df = 2$, $p\text{-value} = 0,0014430$) (Fig.18.A), du sexe ($\chi^2 = 5,3476$, $df = 1$, $p = 0,0208$), du parasite ($\chi^2 = 9,1482$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0,0024896$) et une interaction significative Sexe*Parasite ($\chi^2 = 11,5506$, $df = 1$, $p < 0,001$) ayant été détectés, les résultats sont interprétés séparément pour les ouvrières et les mâles, dont la masse de corps gras est en moyenne plus élevée que celle des ouvrières (Fig. 18.B). Les analyses indiquent que les corps gras des mâles issus de micro-colonies parasitées sont significativement moins développés que les corps gras des individus mâles émergés au sein de micro-colonies saines (Fig. 18.B).

Charge parasitaire : La charge parasitaire des individus est significativement différente en fonction de la diète fournie aux micro-colonies (Day*Diète, $\chi^2 = 46.243$, $df = 14$, $p < 0.001$) (Fig. 19). La charge parasitaire des individus soumis à la diète contrôle de saule décolle à partir du jour 10 et atteint son pic au jour 16 (annexe IV.5A). La hausse de la charge parasitaire est significativement plus tardive pour les individus nourris au pollen de merisier, qui se produit au jour 16 avec un pic de la charge au jour 20 (annexe IV.5B). Finalement, la charge parasitaire des individus nourris à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques augmente à partir du jour 6 et atteint son pic au jour 16 (annexe IV.5C). Tout au long des 35 jours, la charge parasitaire des individus soumis au pollen de saule et à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques est significativement comparable. La charge parasitaire est cependant significativement différente pour les ouvrières nourries au pollen de merisier en comparaison aux ouvrières soumises aux diètes de saule et de flavonoïdes polliniques du jour 4 au jour 8. Les jours 10 et 12, la charge parasitaire des individus nourris au pollen de merisier est toujours significativement inférieure à celle des individus nourris à la diète de flavonoïdes, mais les charges parasitaires des ouvrières soumises aux pollens de merisier et de saule ne sont plus significativement différentes. A partir du jour 16, les charges parasitaires sont toutes significativement semblables, et ce jusqu'à la fin de la période d'élevage.

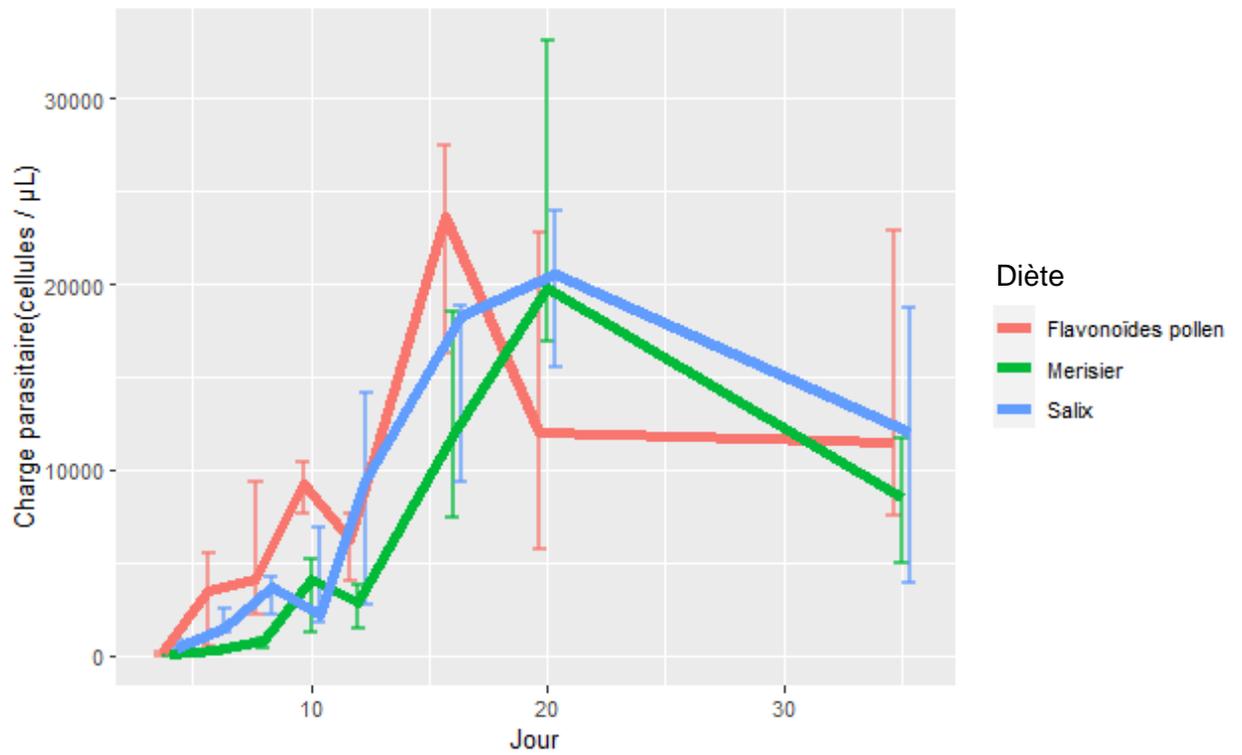


Figure 19 : Impact des différentes diètes sur l'évolution de la charge parasitaire. La charge parasitaire représentée correspond à la médiane de la charge parasitaire des 10 micro-colonies soumise à a diète d'intérêt et les barres d'erreurs représentent les IQR.

Chapitre 5 : DISCUSSION

1. Profil des flavonoïdes

Tout d'abord, les résultats de l'ACP montrent que les 4 tissus testés forment des tissus distincts selon leurs compositions et leurs concentrations en flavonoïdes, démontrant une modulation de la synthèse de composés de défense de la plante et une adaptation de la présence et de la quantité de ces molécules selon le tissu concerné et sa fonction.

La concentration en flavonoïdes diffèrent significativement entre le pollen de merisier et ses autres tissus, suggérant une modulation au moins partielle de la synthèse et de l'allocation de ces composés au niveau du pollen. Le pollen de merisier comporte une quantité plus importante de flavonoïdes que les autres tissus, tendance qui est observée pour de nombreuses autres espèces (Palmer-Young *et al.*, 2019). En effet, dans un premier temps, le pollen nécessite certains composés chimiques pour son développement (Grienenberger *et al.*, 2009) et pour sa protection face à divers organismes herbivores et agents microbiens d'une part et envers certains facteurs abiotiques dommageables tels que la dessiccation et les UVs d'autre part (Pacini & Hesse, 2005). De plus, le pollen est le vecteur des gamètes mâles chez tous les spermatophytes, indispensables à leur reproduction, là où l'unique rôle du nectar est de représenter une récompense florale attractive pour les pollinisateurs. L'allocation de ces composés chimiques étant allouée en priorité aux tissus les plus importants pour la survie et la reproduction de la plante ('Optimal Defense Theory' ; Zangerl & Rutledge, 1996), le pollen en contiendrait à plus haute concentration que le nectar. La capacité à adapter la synthèse de métabolites spécialisés pour le pollen est de plus soutenue par le fait que certains composés, tels que la rhamnétine-O-dihexoside et la quercétine-O-hexosylrhamnosylhexoside pour le merisier, sont présents dans le pollen et absents des feuilles et des corolles.

Le nectar, les feuilles et les corolles possèdent quant à eux un taux de flavonoïdes similaire. Des corrélations entre les taux de métabolites spécialisés des feuilles entre les corolles, les feuilles et le nectar ou encore les corolles et le nectar ont déjà été mises en évidence par d'autres études (Kessler & Halitschke, 2009 ; Kessler *et al.*, 2011 ; Adler *et al.*, 2012 ; Barlow *et al.*, 2017). Cette similarité peut être expliquée par le fait que la présence de métabolites spécialisés dans les récompenses florales serait due à un phénomène de pléiotropie et de spillover physiologique de ces composés produits pour contrer l'herbivorie vers les récompenses florales (Adler *et al.*, 2000). Cela pourrait également être le fruit d'une sélection

artificielle vers une réduction de composés toxiques pour les parties consommables de la plante (Wink, 1988), le merisier étant largement cultivés pour ses fruits et sujet à de la sélection artificielle dans un but commercial. Cependant, comme pour le pollen, certains composés sont spécifiques au nectar, tel que le kaempférol-O-hexosylrhamnosylhexoside pour le merisier, suggérant une adaptation et une allocation sélective de ces composés envers le nectar. Il existe cependant une certaine interdépendance de la composition chimique du pollen et du nectar, due au fait que malgré leur différence fonctionnelle intrinsèque, ils représentent tous deux une récompense florale pour les pollinisateurs et sont donc soumis aux mêmes types d'interactions avec ces derniers.

2. Toxicité des molécules

Le pollen de merisier semble idéal pour le développement des micro-colonies. En effet, les micro-colonies nourries au pollen de merisier ont produit une quantité et une masse de différents stades de développement supérieurs aux autres diètes. Les comportements de dilution pollinique des micro-colonies nourries au pollen de merisier était également inférieure aux autres diètes et son efficacité pollinique était supérieure au pollen de saule et aux diètes supplémentées en flavonoïdes polliniques et foliaires. La formation de micro-colonies plus importantes en termes de nombre et de masse d'individus couplé à une basse dilution pollinique et une efficacité pollinique élevée démontrent une bonne qualité nutritive du pollen de merisier.

La dilution et l'efficacité pollinique de la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques sont comparables à la diète de saule. Le nombre d'individus des différents stades de développement produit par les micro-colonies soumises à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques était également semblable au nombre d'individus produit par les micro-colonies nourries au pollen de saule. Cependant, leur masse était inférieure, suggérant que bien que les micro-colonies se développent au même rythme en termes de nombre d'individus, ces derniers sont moins robustes et plus petits que les individus produits par les micro-colonies nourries à la diète contrôle de saule. La taille et la masse d'un individu étant étroitement associés avec sa capacité de butinage, son taux de survie, sa fécondité et son succès reproductif (Greenleaf *et al.*, 2007 ; Kingsolver & Huey, 2008; Beukeboom, 2018), les flavonoïdes issus du pollen de merisier peuvent donc directement impacter le fitness des individus.

Le nombre et la masse des différents stades de développement produits par les micro-colonies nourries à la diète supplémentée en flavonoïdes foliaires étaient inférieurs en

comparaison aux autres diètes, suggérant que les micro-colonies y étant soumises se développent de manière plus lente et forment des micro-colonies composées d'un nombre plus restreint d'individus. L'éjection larvaire, reflétant le stress que subit la micro-colonie, était particulièrement élevée en comparaison aux autres diètes, certaines micro-colonies ayant éjecté plus de larves que le nombre total d'individus produits par la micro-colonie au bout des 35 jours d'élevage, tout stade inclus (des œufs jusqu'aux mâles émergés). La mauvaise qualité de la diète est de plus soutenue par le fait que cette diète possédait une mauvaise efficacité pollinique et une dilution pollinique plus importante que les diètes de pollen de merisier et de saule. La toxicité peut être causée soit par la nature de ces flavonoïdes, qui diffère selon les tissus, soit par la présence d'autres métabolites spécialisés n'appartenant pas à la classe des flavonoïdes, identifiés dans les extraits (annexe IV.3), soit par ces deux facteurs. Cette toxicité dénote de la modulation de la synthèse de composés de défense par la plante, qui adapte la toxicité de ses tissus en fonction des pressions issues des interactions qu'elle entretient avec les différents organismes.

3. Impact du parasite

La présence de *Crithidia* a impacté certains paramètres mesurés lors des essais biologiques. Le nombre de mâles émergés produit est négativement impacté chez les micro-colonies parasitées. En effet, comme reporté par Shykkof & Schmid-Hempel (1991), l'infection provoque une baisse de la production de mâles, les individus ayant moins d'énergie à allouer à leur système reproducteur et à la production de nouvelles progénitures (Brown *et al.*, 2000). La présence de *Crithidia* affecte également les comportements de dilution pollinique. La dilution pollinique reportée pour les micro-colonies parasitées nourries aux flavonoïdes polliniques est significativement inférieure à la dilution pollinique des micro-colonies saines pour cette diète. Une collecte moindre de sirop est observée, bien que non significative, tandis que la collecte de pollen est équivalente entre les deux traitements. Le taux de mortalité des ouvrières est de plus supérieur chez les micro-colonies parasitées. *Crithidia* est un parasite dont la basse virulence n'impacte pas la mortalité des individus parasités (e.g. Brown *et al.*, 2000). L'augmentation de ce taux de mortalité peut en partie être expliqué par un certain stress nutritif, étant donné que les micro-colonies sont soumises à une diète mono-florale. En effet, les bourdons sont des pollinisateurs généralistes qui collectent une gamme variée de pollen en milieu naturel (Plowright & Laverty, 1984). Un manque de diversité des ressources nutritives peut impacter

la santé des pollinisateurs, certains pollens ayant une basse qualité nutritive ou ne comportant pas tous les nutriments nécessaires pour une nutrition complète (e.g. Moerman *et al.*, 2017 ; Vanderplanck *et al.*, 2018).

A l'échelle individuelle, les corps gras étaient également impactés par la présence du parasite ainsi que son interaction avec le sexe de l'individu. Les corps gras des individus parasités étaient plus développés que les corps gras des individus sains. De même, chez les micro-colonies parasitées, les corps gras des mâles émergés étaient plus développés que les corps gras des mâles soumis au traitement non parasité correspondant. L'infection de *Crithidia* provoque en effet une diminution de l'allocation des ressources du système reproducteur vers les corps gras (Brown *et al.*, 2000), ce qui pourrait expliquer un développement plus important de ces corps gras chez les individus parasités. Les corps gras étaient cependant significativement plus développés chez les mâles des micro-colonies parasitées que les corps gras des ouvrières parasitées. Les corps gras représentent un organe de stockage énergétique important (Law & Hells, 1989). Les mâles émergeant en fin de période d'élevage subissent une période d'exposition au parasitisme plus courte que les ouvrières. La mise en place de mécanismes et de défenses immunitaires étant énergiquement coûteux, les corps gras des ouvrières pourraient en conséquence être moins développés, ayant été exposées à l'infection pour une durée plus importante. Etant donné que les corps gras sont à la fois plus développés chez les individus parasités et moins abondants chez les individus exposés plus longtemps à l'infection, il est évident que certains mécanismes ainsi que l'impact de *Crithidia* sur de leur développement restent à étudier pour une meilleure compréhension des résultats obtenus.

Dans l'ensemble, l'infection par *Crithidia* affecte peut le fitness des individus parasités, étant donné sa basse virulence. En effet, l'infection n'a aucun impact sur la collecte de ressources, le développement des micro-colonies ou encore l'éjection larvaire. La basse virulence de *Crithidia* est également largement reportée dans la littérature (Shykoff & Schmid-Hempel 1991a ; Imhoof & Schmid-Hempel 1999), ce qui explique sa haute prévalence dans les populations naturelles. Cette basse virulence peut poser un problème dans le cadre de ce mémoire. Evaluer les potentiels effets thérapeutiques de certains métabolites chez des individus parasités n'étant que faiblement impactés par la présence du parasite rend l'interprétation des résultats compliquée. Les résultats correspondent d'ailleurs à ce constat : la diète impacte plus les individus que l'infection.

4. Impact de la diète sur la charge parasitaire

Des résultats significatifs ont été observés pour l'impact des différents pollens et extraits de flavonoïdes polliniques sur la charge parasitaire. Chez les ouvrières nourries au pollen contrôle de saule, la charge parasitaire a fortement augmenté du jour 10 au jour 16. Pour les ouvrières nourries au pollen de merisier, la hausse de la charge parasitaire s'est produite au jour 16, avec un pic de la charge au jour 20, dénotant un retard de l'infection parasitaire. En plus de retarder l'infection, la charge parasitaire est réduite durant la première phase de l'infection, jusqu'au jour 8 en comparaison avec la diète de saule et jusqu'au jour 12 par rapport à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques. Ce retard de l'infection et cette réduction de la charge parasitaire suggère certaines propriétés toxiques du pollen de merisier envers *Crithidia*, à l'instar de certains pollens aux propriétés antimicrobiennes déjà décrites (e.g. Giacomini *et al.*, 2018). Les effets des flavonoïdes issus du pollen de merisier sont eux opposés aux résultats observés pour les diètes de pollen pur. Ils ont provoqué une hausse de la charge parasitaire aux alentours du jour 6, ce qui est précoce en comparaison à la littérature (e.g. Imhoof & Schmid-Hempel, 1999 ; Gekière *et al.*, 2022) et aux résultats obtenus pour la diète contrôle de saule. De plus, la charge parasitaire était significativement plus importante en début d'infection, des jours 4 à 8, suggérant un développement plus optimal de *Crithidia* et un phénomène de renforcement de l'infection.

5. Interactions diète - parasite

Les résultats décrit précédemment concernant sa bonne qualité nutritive couplés à la réduction et au retard de la charge parasitaire observés chez les individus parasités soumis au pollen de merisier suggèrent des effets bénéfiques de ce pollen pour les bourdons parasités. La réduction et le retard de l'infection observés ne provoquent cependant pas d'amélioration du fitness de l'hôte, étant donné l'absence de significativité des résultats entre les traitements sains et parasités. Cela peut être expliqué par la basse virulence de *Crithidia*, discutée plus haut.

Pour évaluer l'effet bénéfique d'une ressource, son ingestion doit non seulement être bénéfique pour les individus parasités mais également représenter un coût en termes de valeur sélective et de défenses immunitaires et avoir en conséquence une toxicité non-nulle pour les individus sains. Ce n'est pas le cas pour le pollen de merisier, son ingestion n'ayant pas d'effets toxiques pour les micro-colonies non parasitées. En effet, leur valeur sélective était supérieure, les réponses de stress tels que l'éjection larvaire et le taux de mortalité n'étaient pas plus

importants pour les micro-colonies saines et la dilution pollinique, l'efficacité polliniques et la masse des corps gras étaient semblables en présence ou absence de *Crithidia*. Cette absence de coût énergétique pour les individus sains pourrait être dû au fait que la qualité nutritive du pollen de merisier prend le pas sur le coût énergétique de la médication. Elle peut également être expliquée par la bonne qualité nutritive de la diète. En effet, étant donné que la masse des différents stades de développement était supérieure à la masse des individus produits par les micro-colonies des autres diètes, cela signifie que les individus possèdent plus d'énergie à potentiellement allouer aux mécanismes de défense et à la mise en place de réponses immunes efficaces contre *Crithidia* et par conséquent atténuer les effets néfastes de l'infection. Le pollen de merisier influe donc sur la résistance ainsi que la tolérance des individus envers l'infection. La résistance constitue l'aptitude de l'individu à limiter les effets du parasite en diminuant les risques d'infection et/ou la charge infectieuse (Abbott, 2014) et est donc ici impactée, étant donné le retard de l'infection. Il en est de même pour la tolérance, qui représente une meilleure aptitude à limiter les effets préjudiciables causés par la charge infectieuse (Abbott, 2014). L'ingestion de pollen de merisier améliore la tolérance des individus infectés, aux vues la haute valeur sélective des micro-colonies s'en nourrissant.

La diète supplémentée en flavonoïdes issus du pollen de merisier n'était également pas sans effets sur les individus et micro-colonies parasités. En effet, à l'inverse des effets observés pour le pollen de merisier sur la charge parasitaire, les flavonoïdes polliniques ont eux provoqués une précocité de l'infection et une intensité plus importante de cette dernière. L'augmentation de la charge parasitaire et l'intensité de l'infection causés par l'ingestion de certains métabolites spécialisés est un phénomène déjà documenté pour d'autres molécules telles que les phénolamides de tournesol ou la nicotine (Thorburn *et al.*, 2015 ; Gekière *et al.*, 2022) et peut être expliqué par un affaiblissement des individus dû à un stress physiologique ou à l'altération du microbiote intestinal provoqués par l'ingestion de ces molécules (Thorburn *et al.*, 2015 ; Mockler *et al.*, 2018). Les comportements de dilution pollinique observés pour la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques sont particulièrement importants en comparaison à la diète contrôle, dénotant une toxicité de cette diète pour les individus sains comme discuté plus haut. Cependant, une diminution de cette dilution pollinique est observée chez les micro-colonies parasitées y étant nourries par rapport aux micro-colonies saines. Les comportements de dilution pollinique dénotent un comportement visant à diluer une source de pollen pour en diminuer la toxicité. La toxicité des flavonoïdes polliniques prend ici le pas sur les effets néfastes de l'infection, étant donné une dilution pollinique plus importante chez les micro-

colonies saines. En ce qui concerne les corps gras, ces derniers étaient impactés par l'infection et étaient plus développés chez les individus nourris à la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques que chez les individus nourris au pollen de saule seul. Aucune interaction Parasite*Diète n'a cependant été observée, ne permettant pas de déterminer plus précisément l'effet du parasite sur cette diète en particulier. La diète supplémentée a des effets préjudiciables et une toxicité non-nulle chez les individus sains, mais n'impacte pas positivement la santé des bourdons parasités. Elle augmente au contraire l'intensité de l'infection et augmente la charge parasitaire durant la phase précoce de l'infection. Un développement plus optimal de *Crithidia* couplés à des effets préjudiciables chez les micro-colonies saines démontrent une certaine toxicité des flavonoïdes issus du pollen de merisier chez les bourdons parasités.

Aux vues de ces résultats opposés quant aux effets du pollen de merisier et de ses flavonoïdes sur les bourdons parasités, les flavonoïdes ne représentent pas la classe de métabolites spécialisés responsables de la qualité nutritive ainsi que des effets bénéfiques observés chez les individus parasités nourris au pollen pur.

Les effets de certains composés peuvent cependant varier si les pollinisateurs y sont exposés seul ou en présence d'autres molécules (Hebets & Papaj, 2005), suggérant des différences de propriétés en fonction de la potentielle co-occurrence de certaines molécules. Bien que les flavonoïdes issus du pollen de merisier seuls ne représentent qu'une ressource toxique pour les bourdons, sains ou parasités, on ne peut donc pas conclure à leur totale non-implication dans les effets bénéfiques observés pour le pollen de merisier. En effet, la diète supplémentée est donc constituée de pollen de saule supplémentée en extraits de flavonoïdes. Le pollen de saule n'étant ni neutre ni exempt de métabolites spécialisés, les micro-colonies nourries à cette diète ont donc été soumises à une dose plus importante de métabolites spécialisés, étant donné qu'elle contient à la fois les flavonoïdes issus du pollen de merisier et les composés naturellement présents dans le pollen de saule. Cela pourrait être la cause, au moins en partie, de la forte toxicité observée pour les micro-colonies non parasitées (Gekière *et al.*, soumis au « *Journal of Economic Entomology* »).

Le pollen comportant une large diversité phytochimique (Palmer-Young *et al.*, 2019), d'autres métabolites spécialisés identifiés dans le pollen de merisier (annexe IV.3) peuvent participer aux effets bénéfiques observés pour l'ingestion de pollen de merisier, et éventuellement exprimer d'autres effets lorsqu'ils sont combinés (Biller *et al.*, 2015).

Les merisiers représentent donc une source de composés thérapeutiques pour les bourdons parasités et pourraient permettre d'améliorer la santé des populations sauvages de pollinisateurs, mais également la gestion de pollinisateurs commerciaux et par conséquent la production et le rendement agricole. Il serait donc intéressant de par la suite tester les effets des autres classes de métabolites spécialisés présents dans le pollen de merisier dans le but de déterminer quels métabolites sont responsables des effets bénéfiques observés chez les individus parasités. Tester les conditions de l'automédication pourrait également permettre de déterminer si les bourdons parasités sont capables de reconnaître le pollen de merisier comme ressource thérapeutique et d'adapter leur nutrition selon l'infection.

Chapitre 6 : CONCLUSION

La distribution des flavonoïdes au sein des corolles, des feuilles, du pollen et du nectar est distincte entre les 4 tissus, chacun étant donc différent selon leur composition et leur concentration en flavonoïdes. En ce qui concerne leur toxicité, celle de la diète supplémentée en flavonoïdes foliaires est particulièrement élevée. En effet, le mauvais développement des micro-colonies s'en nourrissant ainsi que sa mauvaise efficacité pollinique et son importante dilution pollinique démontrent sa basse qualité nutritive. De plus, le taux de mortalité des ouvrières et l'éjection larvaires des micro-colonies y étant soumises étaient supérieurs, certaines micro-colonies ayant éjecté plus de larves que d'individus produits tout au long de la période d'élevage, et ce tous stade de développement compris. Cette importante toxicité couplée aux profils de flavonoïdes significativement distincts entre les différents organes de la plante démontre une allocation des métabolites spécialisés ainsi que de leur toxicité selon le tissu.

Concernant l'impact du pollen de merisier et de ses flavonoïdes sur les bourdons sains, leur valeur sélective ainsi que les résultats de l'analyse des différentes réponses de stress indiquent une excellente qualité nutritive du pollen de merisier et une importante toxicité de la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques.

Finalement, l'ingestion de pollen de merisier entraînent des effets bénéfiques pour les bourdons parasités étant donné la haute valeur sélective des micro-colonies parasitées et la basse expression des différentes réponses de stress analysées. Le retard de l'infection ainsi que la diminution de la charge parasitaire durant la phase précoce de l'infection dénotent également une meilleure résistance des individus, même si cela n'améliore pas leur fitness. L'ingestion de ces composés devrait cependant avoir un coût énergétique sur les individus sains pour être qualifiée de thérapeutique, ce qui n'est pas le cas avec le pollen de merisier. Cela peut être expliqué par sa haute qualité nutritive, couvrant la perte d'énergie causée par la mise en place de défenses immunes contre l'infection. Des résultats similaires ne sont pas observés pour la diète supplémentée en flavonoïdes polliniques de merisier, signifiant que les effets bénéfiques que le pollen procure aux individus parasités ne sont pas causés par ses flavonoïdes, tout du moins seuls. Le pollen de merisier comporte d'autres classes de métabolites spécialisés potentiellement responsables de la qualité nutritive observée, seuls ou en synergie avec les autres métabolites présents.

Chapitre 7 : REFERENCES

Abbott, J. (2014). Self-medication in insects: Current evidence and future perspectives. *Ecological Entomology*, 39(3), 273-280.

Abedini, A., Colin, M., Hubert, J., Charpentier, É., Angelis, A., Bounasri, H., ... & Gangloff, S. C. (2020). Abundant extractable metabolites from temperate tree barks: The specific antimicrobial activity of *Prunus avium* extracts. *Antibiotics*, 9(3), 111.

Abouda, Z., Zerdani, I., Kalalou, I., Faid, M., & Ahami, M. T. (2011). The antibacterial activity of Moroccan bee bread and bee-pollen (fresh and dried) against pathogenic bacteria. *Research Journal of Microbiology*, 6(4), 376.

Adler, L. S. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos*, 91(3), 409-420.

Adler, L. S., Seifert, M. G., Wink, M., & Morse, G. E. (2012). Reliance on pollinators predicts defensive chemistry across tobacco species. *Ecology letters*, 15(10), 1140-1148.

Alford, D. V. 1975. *Bumblebees*. London: Davis-Poynter.

Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual review of entomology*, 55, 207-225.

Ashman, T. L., Knight, T. M., Steets, J. A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D. R., ... & Wilson, W. G. (2004). Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology*, 85(9), 2408-2421.

Baracchi, D., Brown, M. J., & Chittka, L. (2015). Weak and contradictory effects of self-medication with nectar nicotine by parasitized bumblebees. *F1000Research*, 4.

Barlow, S. E., Wright, G. A., Ma, C., Barberis, M., Farrell, I. W., Marr, E. C., ... & Stevenson, P. C. (2017). Distasteful nectar deters floral robbery. *Current Biology*, 27(16), 2552-2558.

Baron, G.L., Raine, N.E. & Brown, M.J.F. (2014) Impact of chronic exposure to a pyrethroid pesticide on bumblebees and interactions with a trypanosome parasite. *Journal of Applied Ecology*, 51, 460–469.

Bégou M. 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 2 en Sciences biologiques, Université de Mons, Mons, 82 pp.

Berenbaum, M. R., & Johnson, R. M. (2015). Xenobiotic detoxification pathways in honey bees. *Current opinion in insect science*, 10, 51-58.

Bernardo, M. A., & Singer, M. S. (2017). Parasite-altered feeding behavior in insects: integrating functional and mechanistic research frontiers. *Journal of Experimental Biology*, 220(16), 2848-2857.

Beukeboom, L. W. (2018). Size matters in insects—an introduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 166(1), 2-3.

Biller, O. M., Adler, L. S., Irwin, R. E., McAllister, C., & Palmer-Young, E. C. (2015). Possible synergistic effects of thymol and nicotine against *Crithidia bombi* parasitism in bumble bees. *PLoS one*, 10(12), e0144668.

Bonora, A., Botta, B., Menziani-Andreoli, E., & Bruni, A. (1988). Organ-specific distribution and accumulation of protoanemonin in *Ranunculus ficaria* L. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 183(5), 443-447.

Boyd, R. S. (2007). The defense hypothesis of elemental hyperaccumulation: status, challenges and new directions. *Plant and Soil*, 293(1), 153-176.

Brown, M. J. F., Loosli, R., & Schmid-Hempel, P. (2000). Condition-dependent expression of virulence in a trypanosome infecting bumblebees. *Oikos*, 91(3), 421-427.

Brown, M. J. F., Moret, Y., & Schmid-Hempel, P. (2003). Activation of host constitutive immune defence by an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology*, 126(3), 253-260.

Chapuisat, M., Oppliger, A., Magliano, P., & Christe, P. (2007). Wood ants use resin to protect themselves against pathogens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1621), 2013-2017.

Clayton, D. H., & Wolfe, N. D. (1993). The adaptive significance of self-medication. *Trends in Ecology & Evolution*, 8(2), 60-63.

Cole, R.J. (1970) The application of the “triangulation” method to the purification of *Nosema* spores from insect tissues. *Journal of Invertebrate Pathology*, 15, 193–195.

Core A. et al., 2012. A new threat to honey bees, the parasitic phorid fly *Apocephalus borealis*. *PLoS One*, 7(1) : e29639, 1–9.

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *science*, 287(5452), 443-449.

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.

Decourtye, A., & Devillers, J. (2010). Ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to bees. *Insect nicotinic acetylcholine receptors*, 85-95.

de Roode, J. C., Lefèvre, T., & Hunter, M. D. (2013). Self-medication in animals. *Science*, 340(6129), 150-151.

Di Carlo, G., Mascolo, N., Izzo, A. A., & Capasso, F. (1999). Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, 65(4), 337-353.

Dirlewanger, E., Quero-Garcia, J., Le Dantec, L., Lambert, P., Ruiz, D., Dondini, L., ... & Arús, P. (2012). Comparison of the genetic determinism of two key phenological traits, flowering and maturity dates, in three *Prunus* species: peach, apricot and sweet cherry. *Heredity*, 109(5), 280-292.

Durrer, S., & Schmid-Hempel, P. (1994). Shared use of flowers leads to horizontal pathogen transmission. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 258(1353), 299-302.

Eeraerts, M., Vanderhaegen, R., Smagghe, G., & Meeus, I. (2020). Pollination efficiency and foraging behaviour of honey bees and non-*Apis* bees to sweet cherry. *Agricultural and Forest Entomology*, 22(1), 75-82.

Eisikowitch, D., Lachance, M. A., Kevan, P. G., Willis, S., & Collins-Thompson, D. L. (1990). The effect of the natural assemblage of microorganisms and selected strains of the yeast *Metschnikowia reukauffii* in controlling the germination of pollen of the common milkweed *Asclepias syriaca*. *Canadian Journal of Botany*, 68(5), 1163-1165.

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.

Fausser-Misslin, A., Sadd, B. M., Neumann, P., & Sandrock, C. (2014). Influence of combined pesticide and parasite exposure on bumblebee colony traits in the laboratory. *Journal of Applied Ecology*, 51(2), 450-459.

Ferguson JA, Northfield TD, Lach L: Honey bee (*Apis mellifera*) pollen foraging reflects benefits dependent on individual infection status. *Microbial Ecology* 2018, 76:482-491

Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G., & Scheffer, J. J. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance journal*, 23(4), 213-226.

Fisher, R. M., & Pomeroy, N. (1989). Incipient colony manipulation, *Nosema* incidence and colony productivity of the bumble bee *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 581-589.

Folly, A. J., Koch, H., Stevenson, P. C., & Brown, M. J. (2017). Larvae act as a transient transmission hub for the prevalent bumblebee parasite *Crithidia bombi*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 148, 81-85.

Fouks, B., & Lattorff, H. M. G. (2011). Recognition and avoidance of contaminated flowers by foraging bumblebees (*Bombus terrestris*). *PLoS One*, 6(10), e26328.

Fraenkel, G. S. (1959). The Raison d'Être of Secondary Plant Substances: These odd chemicals arose as a means of protecting plants from insects and now guide insects to food. *Science*, 129(3361), 1466-1470.

Fridman, S., Izhaki, I., Gerchman, Y., & Halpern, M. (2012). Bacterial communities in floral nectar. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 97-104.

Galai N, Salles J-M, Settele J et al (2009) Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecol Econ* 68:810–821

Garibaldi, L. A., Aizen, M. A., Cunningham, S., & Klein, A. M. (2009). Pollinator shortage and global crop yield: looking at the whole spectrum of pollinator dependency. *Communicative & Integrative Biology*, 2(1), 37-39.

Gegear, R. J., Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2006). Bumble-bee foragers infected by a gut parasite have an impaired ability to utilize floral information. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1590), 1073-1078.

Gekière, A., Michez, D. and Vanderplanck, M. Bumble bee breeding on artificial pollen substitutes. Submitted in *Journal of Economic Entomology*

Gekière, A., Semay, I., Gérard, M., Michez, D., Gerbaux, P., & Vanderplanck, M. (2022). Poison or Potion: Effects of Sunflower Phenolamides on Bumble Bees and Their Gut Parasite. *Biology*, 11(4), 545.

Genersch E., 2010. Honey bee pathology: Current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 87–97.

Giacomini, J. J., Leslie, J., Tarpy, D. R., Palmer-Young, E. C., Irwin, R. E., & Adler, L. S. (2018). Medicinal value of sunflower pollen against bee pathogens. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.

Giannini, T. C., Cordeiro, G. D., Freitas, B. M., Saraiva, A. M., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (2015). The dependence of crops for pollinators and the economic value of pollination in Brazil. *Journal of economic entomology*, 108(3), 849-857.

Gillespie and, J. P., Kanost, M. R., & Trenzcek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, 42(1), 611-643.

Goldingay, R. L., Carthew, S. M., & Whelan, R. J. (1991). The importance of non-flying mammals in pollination. *Oikos*, 79-87.

Goulson, D. (2003). Effects of introduced bees on native ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 1-26.

Goulson, D., & Darvill, B. (2004). Niche overlap and diet breadth in bumblebees; are rare species more specialized in their choice of flowers?. *Apidologie*, 35(1), 55-63.

Goulson, D. (2010). Bumblebees.

Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. L. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, 347(6229), 1255957.

Gradish, A. E., Scott–Dupree, C. D., Mcfarlane, A. D., & Frewin, A. J. (2013). Too much work, not enough tarsi: group size influences *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) worker reproduction with implications for sublethal pesticide toxicity assessments. *Journal of economic entomology*, 106(2), 552-557.

Graystock, P., Meeus, I., Smagghe, G., Goulson, D., & Hughes, W. O. (2016). The effects of single and mixed infections of *Apicystis bombi* and deformed wing virus in *Bombus terrestris*. *Parasitology*, 143(3), 358-365.

Grienenberger, E., Besseau, S., Geoffroy, P., Debayle, D., Heintz, D., Lapierre, C., ... & Legrand, M. (2009). A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *The Plant Journal*, 58(2), 246-259.

Greenleaf, S. S., Williams, N. M., Winfree, R., & Kremen, C. (2007). Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153(3), 589-596.

Gurel, F., Gosterit, A. Y. H. A. N., & Eren, Ö. (2008). Life-cycle and foraging patterns of native *Bombus terrestris* (L.)(Hymenoptera, Apidae) in the Mediterranean region. *Insectes Sociaux*, 55(2), 123-128.

Hanbali, L., G Amiry, J., M Ghadieh, R., A Hasan, H., S Koussan, S., K Nakhal, Y., ... & J Haddad, J. (2012). The Antimicrobial Activity of Sweet Cherry (*Prunus avium*) Extracts: II. Measurement of Sensitivity and Attenuation of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and *C. albicans* in Culture. *Current Nutrition & Food Science*, 8(4), 292-303.

Hanbali LB, Ghadieh RM, Hasan HA, Nakhal YK, Haddad JJ. Measurement of antioxidant activity and antioxidant compounds under versatile extraction conditions: I. the immuno-biochemical antioxidant properties of sweet cherry (*Prunus avium*) extracts. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)*, (2013); 12(2): 173-187

Harborne, J. B. (1993). Advances in chemical ecology. *Natural Product Reports*, 10(4), 327-348.

Harborne, J. B., & Grayer, R. J. (2017). Flavonoids and insects. In *The flavonoids* (pp. 589-618). Routledge.

Harder, L. D., & Thomson, J. D. (1989). Evolutionary options for maximizing pollen dispersal of animal-pollinated plants. *The American Naturalist*, 133(3), 323-344.

Hargreaves, A. L., Harder, L. D., & Johnson, S. D. (2009). Consumptive emasculation: the ecological and evolutionary consequences of pollen theft. *Biological Reviews*, 84(2), 259-276.

Hebets, E. A., & Papaj, D. R. (2005). Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57(3), 197-214.

Hegland, S. J., Nielsen, A., Lázaro, A., Bjerknes, A. L., & Totland, Ø. (2009). How does climate warming affect plant-pollinator interactions?. *Ecology letters*, 12(2), 184-195.

Herrera, C. M., de Vega, C., Canto, A., & Pozo, M. I. (2009). Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of botany*, 103(9), 1415-1423.

Hetru, C. (1998). Antimicrobial peptides from insects. *Molecular mechanisms of immune responses in insects*.

Hristov, P., Neov, B., Shumkova, R., & Palova, N. (2020). Significance of apoidea as main pollinators. ecological and economic impact and implications for human nutrition. *Diversity*, 12(7), 280.

Imhoof, B., & Schmid-Hempel, P. (1999). Colony success of the bumble bee, *Bombus terrestris*, in relation to infections by two protozoan parasites, *Crithidia bombi* and *Nosema bombi*. *Insectes Sociaux*, 46

Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.

Jacobsen, D. J., & Raguso, R. A. (2018). Lingering effects of herbivory and plant defenses on pollinators. *Current Biology*, 28(19), R1164-R1169.

Jang, G. H., Kim, H. W., Lee, M. K., Jeong, S. Y., Bak, A. R., Lee, D. J., & Kim, J. B. (2018). Characterization and quantification of flavonoid glycosides in the *Prunus* genus by UPLC-DAD-QTOF/MS. *Saudi journal of biological sciences*, 25(8), 1622-1631.

Jannesar, M., Shoushtari, M. S., Majd, A., & Pourpak, Z. (2017). Bee pollen flavonoids as a therapeutic agent in allergic and immunological disorders. *Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology*, 171-182.

Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M., & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(7), 2897-2908.

Jesus, F., Gonçalves, A. C., Alves, G., & Silva, L. R. (2020). Health Benefits of *Prunus avium* Plant Parts: An Unexplored Source Rich in Phenolic Compounds. *Food Reviews International*, 1-29.

Kacsoh, B. Z., Lynch, Z. R., Mortimer, N. T., & Schlenke, T. A. (2013). Fruit flies medicate offspring after seeing parasites. *Science*, 339(6122), 947-950.

Kessler, A., & Halitschke, R. (2009). Testing the potential for conflicting selection on floral chemical traits by pollinators and herbivores: predictions and case study. *Functional Ecology*, 901-912.

Kessler, A., Halitschke, R., & Poveda, K. (2011). Herbivory-mediated pollinator limitation: negative impacts of induced volatiles on plant–pollinator interactions. *Ecology*, 92(9), 1769-1780.

Kingsolver, J. G., & Huey, R. B. (2008). Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research*, 10(2), 251-268.

Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313.

Koch, H., Woodward, J., Langat, M.K., Brown, M.J.F. & Stevenson, P.C. (2019) Flagellum removal by a nectar metabolite inhibits infectivity of a bumblebee parasite. *Current Biology*, 29, 3494-3500.e5. Elsevier Ltd.

Kretschmar, J. A., & Baumann, T. W. (1999). Caffeine in Citrus flowers. *Phytochemistry*, 52(1), 19-23.

Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 30(3), 131-141.

Law, J. H., & Wells, M. A. (1989). Insects as biochemical models. *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16335-16338.

Li, D., Heiling, S., Baldwin, I. T., & Gaquerel, E. (2016). Illuminating a plant's tissue-specific metabolic diversity using computational metabolomics and information theory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(47), E7610-E7618.

Lefèvre, T., Oliver, L., Hunter, M. D., & De Roode, J. C. (2010). Evidence for trans-generational medication in nature. *Ecology Letters*, 13(12), 1485-1493.

Logan, A., Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2005). The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology*, 130(6), 637-642.

Lipa, J. J., & Triggiani, O. (1988). *Crithidia bombi* sp. n. a flagellated parasite of a bumble-bee *Bombus terrestris* L.(Hymenoptera, Apidae). *Acta protozoologica*, 27(3-4).

Logan, A., Ruiz-González, M. X., & Brown, M. J. F. (2005). The impact of host starvation on parasite development and population dynamics in an intestinal trypanosome parasite of bumble bees. *Parasitology*, 130(6), 637-642.

Mancinelli, A. L. (1983). The photoregulation of anthocyanin synthesis. In *Photomorphogenesis* (pp. 640-661). Springer, Berlin, Heidelberg.

Manson, J. S., Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2010). Consumption of a nectar alkaloid reduces pathogen load in bumble bees. *Oecologia*, 162(1), 81-89.

Martin, C.D., Fountain, M.T. & Brown, M.J.F. (2018) Bumblebee olfactory learning affected by task allocation but not by a trypanosome parasite. *Scientific Reports*, 8, 1–8. Springer US.

Mateos-Fierro, Z., Garratt, M. P., Fountain, M. T., Ashbrook, K., & Westbury, D. B. (2022). Wild bees are less abundant but show better pollination behaviour for sweet cherry than managed pollinators. *Journal of Applied Entomology*, 146(4), 361-371.

Mawdsley, J. R. (2003). The importance of species of *Dasytinae* (Coleoptera: Melyridae) as pollinators in western North America. *The Coleopterists Bulletin*, 57(2), 154-160.

Meeus, I., Pisman, M., Smaghe, G., & Piot, N. (2018). Interaction effects of different drivers of wild bee decline and their influence on host–pathogen dynamics. *Current opinion in insect science*, 26, 136-141.

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

Milan, N. F., Kacsoh, B. Z., & Schlenke, T. A. (2012). Alcohol consumption as self-medication against blood-borne parasites in the fruit fly. *Current Biology*, 22(6), 488-493.

Mockler, B.K.; Kwong, W.K.; Moran, N.A.; Koch, H. Microbiome structure influences infection by the parasite *Crithidia bombi* in bumble bees. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018, 84, 1–11.

Moerman, R., Roger, N., De Jonghe, R., Michez, D., & Vanderplanck, M. (2016). Interspecific variation in bumblebee performance on pollen diet: new insights for mitigation strategies. *PLoS One*, 11(12), e0168462.

Moerman, R., Vanderplanck, M., Fournier, D., Jacquemart, A. L., & Michez, D. (2017). Pollen nutrients better explain bumblebee colony development than pollen diversity. *Insect Conservation and Diversity*, 10(2), 171-179.

Muth, F. (2021). Intra-specific differences in cognition: bumblebee queens learn better than workers. *Biology Letters*, 17(8), 20210280.

Nicholls, E., Rands, S. A., Botías, C., & Hempel de Ibarra, N. (2022). Flower sharing and pollinator health: a behavioural perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1853), 20210157.

Noël, G., Bebermans, J., Gengler, N., & Francis, F. (2018). Rôle de la transmission des maladies dans le déclin des pollinisateurs–Synthèse bibliographique. *Entomologie Faunistique*, 71.

Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3), 321-326.

Otterstatter, M. C., Gegear, R. J., Colla, S. R., & Thomson, J. D. (2005). Effects of parasitic mites and protozoa on the flower constancy and foraging rate of bumble bees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 58(4), 383-389.

Otterstatter, M. C., & Thomson, J. D. (2008). Does pathogen spillover from commercially reared bumble bees threaten wild pollinators?. *PloS one*, 3(7), e2771.

Pacini, E., & Hesse, M. (2005). Pollenkitt—its composition, forms and functions. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 399-415.

Pacini, E. (2008). Pollination. *Encyclopedia of ecology*, 2857-2861.

Pamminger, T., Botías, C., Goulson, D., & Hughes, W. O. (2018). A mechanistic framework to explain the immunosuppressive effects of neurotoxic pesticides on bees. *Functional Ecology*, 32(8), 1921-1930.

Pereira, K. D. S., Parmentier, L., Piot, N., de Miranda, J. R., Smagghe, G., & Meeus, I. (2021). Managed bumble bees acquire parasites from their foraging environment: A case study on parasite spillback. *Journal of Invertebrate Pathology*, 182, 107583.

Pérez-Mellado, V., & Casas, J. L. (1997). Pollination by a lizard on a Mediterranean island. *Copeia*, 1997(3), 593-595.

Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445.

Pigliucci, M. (2003). Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology letters*, 6(3), 265-272.

Plowright, R. C., and T. M. Laverty. "The ecology and sociobiology of bumble bees." *Annual review of entomology* 29 (1984): 175-199.

Pomeroy, N., & Plowright, R. C. (1979). Larval ejection following narcosis of bumble bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 215-217.

Power, A. G., & Mitchell, C. E. (2004). Pathogen spillover in disease epidemics. *the american naturalist*, 164 (S5), S79-S89.

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, January). An overview of the *Bombus terrestris* (L. 1758) subspecies (Hymenoptera: Apidae). In *Annales de la Société entomologique de France* (Vol. 44, No. 2, pp. 243-250). Taylor & Francis Group.

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.

Reddi, C. S., & Bai, G. M. (1984). Butterflies and pollination biology. *Proceedings: Animal Sciences*, 93(4), 391-396.

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.

Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.

Rivest & Forrest 2020 : Defence compounds in pollen: why do they occur and how do they affect the ecology and evolution of bees?

Robinson, W.E., and R.A. Morse. 1989. The value of honeybees as pollinators of US crops. *American Bee Journal* 129 (1): 477-487.

Roger, N., Michez, D., Wattiez, R., Sheridan, C., & Vanderplanck, M. (2017). Diet effects on bumblebee health. *Journal of Insect Physiology*, 96, 128-133.

Rolff, J., & Schmid-Hempel, P. (2016). Perspectives on the evolutionary ecology of arthropod antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150297.

Rosales, C., & Vonnice, S. (2017). Cellular and molecular mechanisms of insect immunity. *Insect physiology and ecology*, 179-212.

Ruiz-González, M. X., Kelly, M., Moret, Y., & Brown, M. J. (2022). Parasite resistance and immunity across female castes in a social insect. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 76(4), 1-8.

Sadd, B. M., & Barribeau, S. M. (2013). Heterogeneity in infection outcome: lessons from a bumblebee-trypanosome system. *Parasite Immunology*, 35(11), 339-349.

Sawicki, T., Starowicz, M., Kłębukowska, L., & Hanus, P. (2022). The profile of polyphenolic compounds, contents of total phenolics and flavonoids, and antioxidant and antimicrobial properties of bee products. *Molecules*, 27(4), 1301.

Schmitt, A., Roy, R., & Carter, C. J. (2021). Nectar antimicrobial compounds and their potential effects on pollinators. *Current Opinion in Insect Science*.

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. (1998) *Parasites in Social Insects*. P. in.: Princeton University Press, Princeton, New-Jersey

Schmid-Hempel, R., Salathé, R., Tognazzo, M., & Schmid-Hempel, P. (2011). Genetic exchange and emergence of novel strains in directly transmitted trypanosomatids. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(3), 564-571.

Schwarz R.S., Huang Q. & Evans J.D., 2015. Hologenome theory and the honey bee pathosphere. *Current Opinion in Insect Sciences*,10, 1–7.

Shykoff, J. A., & Schmid-Hempel, P. (1991a). Incidence and effects of four parasites in natural populations of bumble bees in Switzerland. *Apidologie*, 22(2), 117-125.

Shykoff, J.A. and P. Schmid-Hempel, 1991b. Genetic relatedness and eusociality: parasite-mediated selection on the genetic composition of groups. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 28: 371–376.

Silva, F., Guirgis, A., von Aderkas, P., Borchers, C. H., & Thornburg, R. (2020). LC-MS/MS based comparative proteomics of floral nectars reveal different mechanisms involved in floral defense of *Nicotiana* spp., *Petunia hybrida* and *Datura stramonium*. *Journal of proteomics*, 213, 103618.

Simpson, A. G., Stevens, J. R., & Lukeš, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*, 22(4), 168-174.

Singer, M. S., Mace, K. C., & Bernays, E. A. (2009). Self-medication as adaptive plasticity: increased ingestion of plant toxins by parasitized caterpillars. *PloS one*, 4(3), e4796.

Subramanya, S., & Radhamani, T. R. (1993). Pollination by birds and bats. *Current Science*, 201-209.

Sladen, F. W. L. (1912). How Pollen is Collected by the Honey-bee. *Nature*, 88(2209), 586-587.

Ssymank, A., Kearns, C. A., Pape, T., & Thompson, F. C. (2008). Pollinating flies (Diptera): a major contribution to plant diversity and agricultural production. *Biodiversity*, 9(1-2), 86-89.

Strand, M. R. (2008). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect immunology*, 32, 25-47.

Tasei, J.N. & Aupinel, P. (2008b) Validation of a method using queenless *Bombus terrestris* micro-colonies for testing the nutritive value of commercial pollen mixes by comparison with queenright colonies. *Journal of Economic Entomology*, 101, 1737–1742.

Thorburn, L. P., Adler, L. S., Irwin, R. E., & Palmer-Young, E. C. (2015). Variable effects of nicotine, anabasine, and their interactions on parasitized bumble bees. *F1000Research*, 4.

Tiedeken, E. J., Stout, J. C., Stevenson, P. C., & Wright, G. A. (2014). Bumblebees are not deterred by ecologically relevant concentrations of nectar toxins. *Journal of Experimental Biology*, 217 (9), 1620-1625.

Tiedeken, E. J., Egan, P. A., Stevenson, P. C., Wright, G. A., Brown, M. J., Power, E. F., ... & Stout, J. C. (2016). Nectar chemistry modulates the impact of an invasive plant on native pollinators. *Functional Ecology*, 30(6), 885-893.

Tsakas, S., & Marmaras, V. J. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 228-238.

Vanderplanck, M., Decleves, S., Roger, N., Decroo, C., Caulier, G., Glauser, G., Gerbaux, P., nLognay, G., Richel, A., Escaravage, N. & Michez, D. (2018) Is non-host pollen suitable for generalist bumblebees? *Insect Science*, 25, 259–272.

Velu, G., Palanichamy, V., & Rajan, A. P. (2018). Phytochemical and pharmacological importance of plant secondary metabolites in modern medicine. In *Bioorganic phase in natural food: an overview* (pp. 135-156). Springer, Cham.

Vivino, A. Earl, and L. S. Palmer. "The chemical composition and nutritional value of pollens collected by bees." *Arch. Biochem.* 4 (1944): 129-136.

Wang, X. Y., Tang, J., Wu, T., Wu, D., & Huang, S. Q. (2019). Bumblebee rejection of toxic pollen facilitates pollen transfer. *Current Biology*, 29(8), 1401-1406.

Whittington, R., & Winston, M. L. (2004). Comparison and examination of *Bombus occidentalis* and *Bombus impatiens* (Hymenoptera: Apidae) in tomato greenhouses. *Journal of Economic Entomology*, 97(4), 1384-1389.

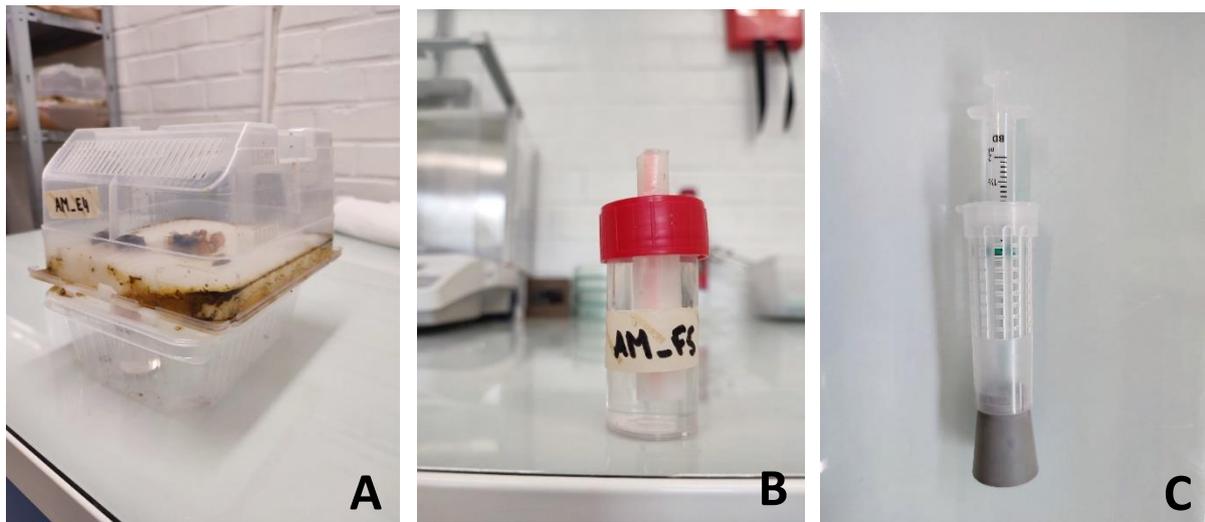
Wink, M. (1988). Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and applied genetics*, 75(2), 225-233..

Zachary, Daniel, and Daniele Hoffmann. "Lysozyme is stored in the granules of certain haemocyte types in *Locusta*." *Journal of insect physiology* 30.5 (1984): 405-411.

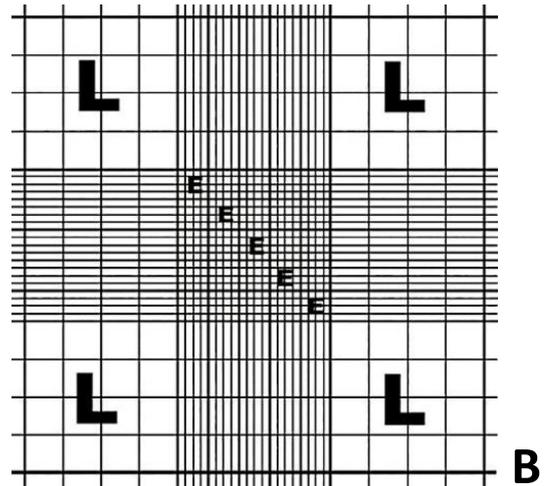
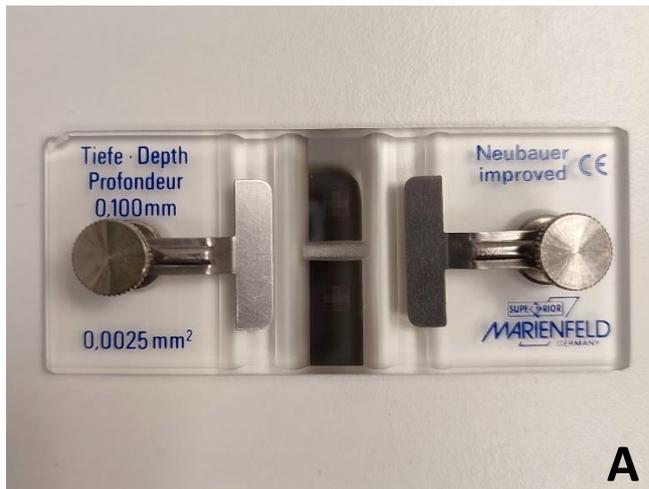
Zangerl, A. R., & Rutledge, C. E. (1996). The probability of attack and patterns of constitutive and induced defense: a test of optimal defense theory. *The American Naturalist*, 147(4), 599-608.

ANNEXES

Annexe I – Elevage des micro-colonies



Annexe I.1 – Matériel d'élevage. A. Montage d'une micro-colonie : Chaque micro-colonie compte 5 ouvrières et se compose d'un bac contenant un pot de sirop de sucre 65% (w/w) surmonté de la boîte de micro-colonie (10*16*16cm). Les micro-colonies sont supplémentées tous les 2 jours de candies de pollen frais grâce auxquelles les ouvrières forment leur colonie. **B. Pot de sirop et son capillaire :** le pot est régulièrement rempli et mis à disposition des ouvrières sous la boîte de la micro-colonie. Le sirop monte par capillarité dans le capillaire, devenant ainsi accessible pour les ouvrières. **C. Cage Nicot® :** lors de l'inoculation de *Crithidia*, les ouvrières à parasiter sont individuellement isolées dans une cage Nicot ®. Un total 10µL d'inoculum est introduit au niveau de l'extrémité du tips de la seringue, permettant ainsi aux ouvrières précédemment affamées de se nourrir de l'inoculum et d'ingérer *Crithidia*.

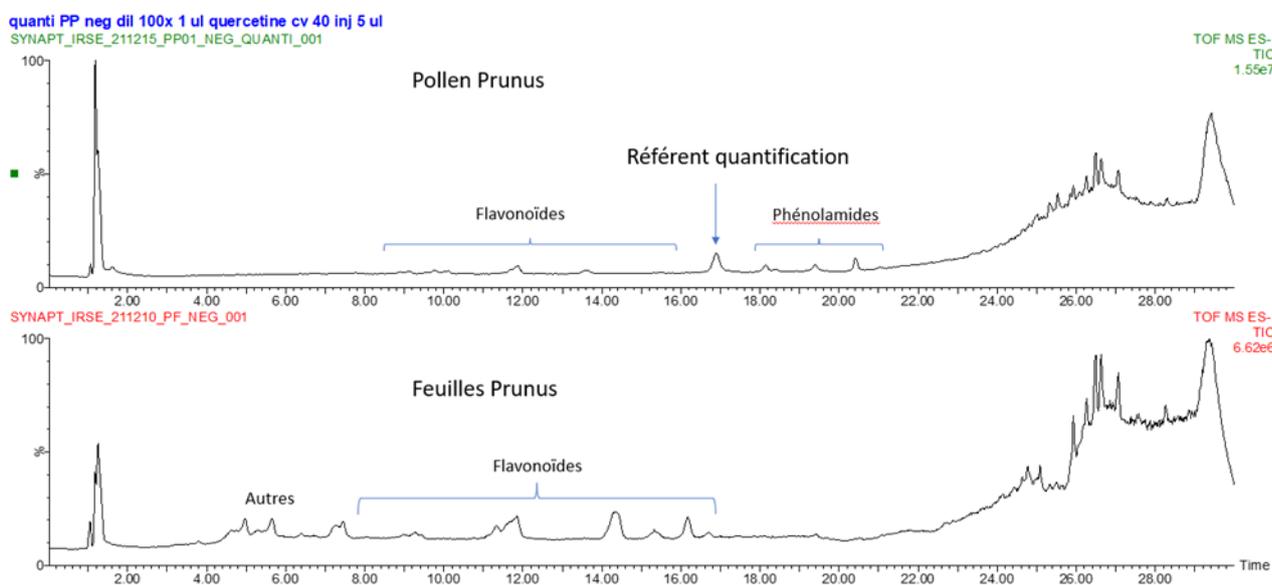


Annexes I.2 - Matériel de comptage. A. Chambre de Neubauer : Sept μL de fèces recollectées sont introduites dans une chambre de Neubauer et observées à l'aide d'un microscope à contraste de phase en phase 2 et à un grossissement 400x (Eclipse Ts2R, Nikon; Tokyo, Japan). Les cellules de *Crithidia* sont dénombrées dans les 5 carrés formant la diagonale de la chambre (**B.**). Si le nombre de cellules excède 50 par carré, les fèces sont diluées (2, 5 ou 10x en fonction des besoins) à la solution saline (0.9% NaCl). La concentration en *Crithidia* est ensuite déterminée par la multiplication de la moyenne de nombre de cellules par carré, de la dilution et d'un facteur propre à la chambre de Neubauer.

Annexe II – Analyses chimiques

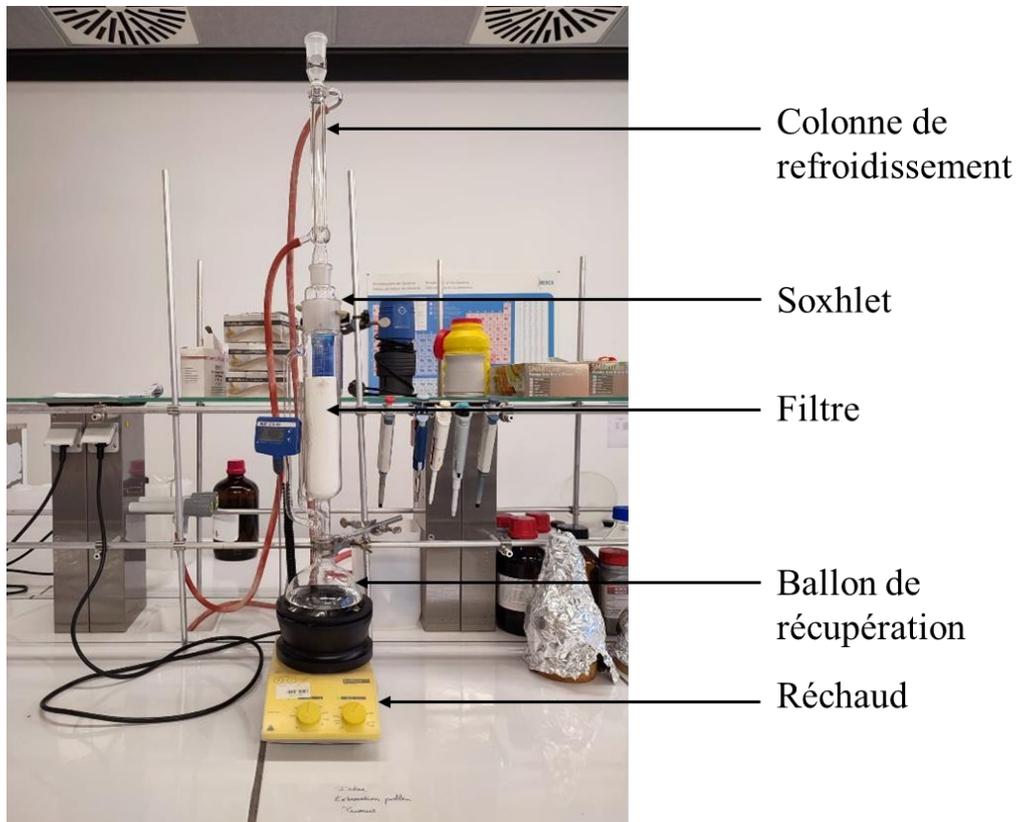
Annexe II.1 : Tableau des conditions MS de l'analyse de spectrométrie. Un volume de 5µL est injecté dans le spectromètre en ionisation électrospray (ESI) en mode négatif sur une gamme de masse de 50 à 2000 Da selon les conditions MS ci-jointes.

Tension du capillaire	3.1kV (2.5kV pour le nectar)
Tension du cône	+30V (+40V pour le nectar)
Température de la source	120°C
Température du gaz	300°C
Débit du gaz	500L/h
Durée de balayage	0.5s



Annexe II.2 – Spectres MALDI. Une analyse préliminaire globale du profil des métabolites spécialisés du pollen et des feuilles de merisier est effectuée. Le référent de quantification utilisé est la rutine pour le pollen et la quercétine-3,4''-O-diglucoside pour les feuilles. L'analyse s'est effectuée par un spectromètre de masse Waters™ Synapt G2-Si. Une différence de profil est détectée entre les flavonoïdes issus des deux tissus. Cette différence de profil couplée avec leurs propriétés antioxydantes

et thérapeutiques déjà connues et documentées, les flavonoïdes ont été sélectionnés comme molécules d'intérêt pour ce mémoire.



Annexe II.3 - Montage du Soxhlet. L'extraction de 400g de pollen de merisier est effectuée à 100°C durant environ 48h. Le pollen est pesé à l'aide d'une balance analytique puis introduit et tassé dans le filtre avant d'être placé dans le Soxhlet. Le solvant d'extraction, ici le méthanol, cycle de manière continue à travers le filtre par évaporation et condensation. L'extrait final est récupéré dans le ballon et évaporé au rotavapeur (IKA RV8).

Annexe III – Protocoles expérimentaux

Annexe III.1. Purification de *Crithidia bombi*.

Les fèces recoltées sont dans un premier temps amenées à un volume total d'1µL à l'aide de solution saline (NaCl 0,9%). La solution obtenue est centrifugée 2 minutes à 0.8G. Le surnageant est prélevé et transféré dans un nouveau tube, tandis que le culot du premier tube est resuspendu dans 1µL de solution saline. Ce protocole est répété jusqu'à l'obtention de 8 tubes. Les tubes 4, 5 et 6 sont ensuite centrifugés 1 minutes à 8G avant d'être débarrassé de leur surnageant. Le culot du tube 4 est resuspendu dans 100µL de solution saline et redissout. La solution obtenue est transférée au tube 5, homogénéisée à nouveau et le tout est transféré au tube 6 avant d'être homogénéisé.

Annexe III.2. Tableau des formules de diète. Détermination de la composition des diètes d'extraits de flavonoïdes imitant des concentrations réalistes trouvées dans les diètes naturelles. Les collectes massives ont dans un premier temps subi une extraction soxhlet (c.f. annexe II.3.) avant d'être dissous dans une solution aqueuse d'éthanol (1 :1 v/v) dans le but d'en compléter du pollen de saule pour imiter les concentrations de flavonoïdes trouvées dans le pollen de merisier, à savoir 19.44662573 mg de flavonoïdes/g de feuilles et 39.6379207 mg de flavonoïdes/g de pollen. Les quantités finales calculées sont suffisantes pour compléter les 10 micro-colonies durant la période d'expérimentation (à hauteur d'une consommation de candie de 1g de pollen).

Diètes				
	Diète contrôle (saule)	Diète de merisier	Diète supplémentée (saule avec extrait de flavonoïdes issus du pollen de merisier)	Diète supplémentée (saule avec extrait de flavonoïdes issus des feuilles de merisier)
Pollen (g)	10 (saule)	10 (merisier)	10 (saule)	10 (saule)
Sirop de sucre 65% (nombre de goutte)	5	5	0	0
Ethanol aqueux (v:v, 1:1) (mL)	0.5	0.5	0	0

Eau distillée (mL)	4	3.5	0	0
Extrait de flavonoïdes (mL)	0	0	4.5	4.6
Masse finale du candie (g)	14.69	14.19	14.96	14.6
Ethanol dans le candie final (μL/g)	17.02	17.62	20.29	16.48
Pollen dans le candie final(g/g)	0.68	0.70	0.67	0.68
Flavonoïdes dans le candie final (mg/g)	11.89	11.87	10.8	5.86

Annexe IV – Compléments de résultats

Annexe IV.1 - Tableau récapitulatif des concentrations totales de flavonoïdes (mg de flavonoïdes /g de tissu) quantifiées pour chaque individu en fonction des différents tissus analysés. La quantification des flavonoïdes issus des feuilles, pétales, pollen et nectar est réalisée par HPLC-MS. Les différents tissus sont préalablement broyés (à l'exception du pollen) et subissent une série de manipulations dans le but d'en extraire les flavonoïdes et de préparer la solution à injecter dans le spectromètre.

	Plante 1	Plante 2	Plante 3	Plante 4	Plante 5	Moyenne
Feuilles	18,202637	18,2021200	20,8915787	20,164876	19,771915	19,446625
Corolles	21,7494069	19,6357463	23,4641564	19,348418	23,272318	21,49400
Pollen	39,7735357	43,0723795	43,5846415	37,731928	34,027118	39,63792
Nectar	30,084191	25,691997	16,993696	15,469787	15,529046	20,7537

Annexe IV.2 Tableau de la composition en flavonoïdes, identifiés dans les feuilles, corolles, pollen et nectar. La caractérisation des flavonoïdes issus des feuilles, pétales, pollen et nectar est réalisée par HPLC-MS. Les différents tissus sont préalablement broyés (à l'exception du pollen) et subissent une série de manipulations dans le but d'en extraire les flavonoïdes et de préparer la solution à injecter dans le spectromètre.

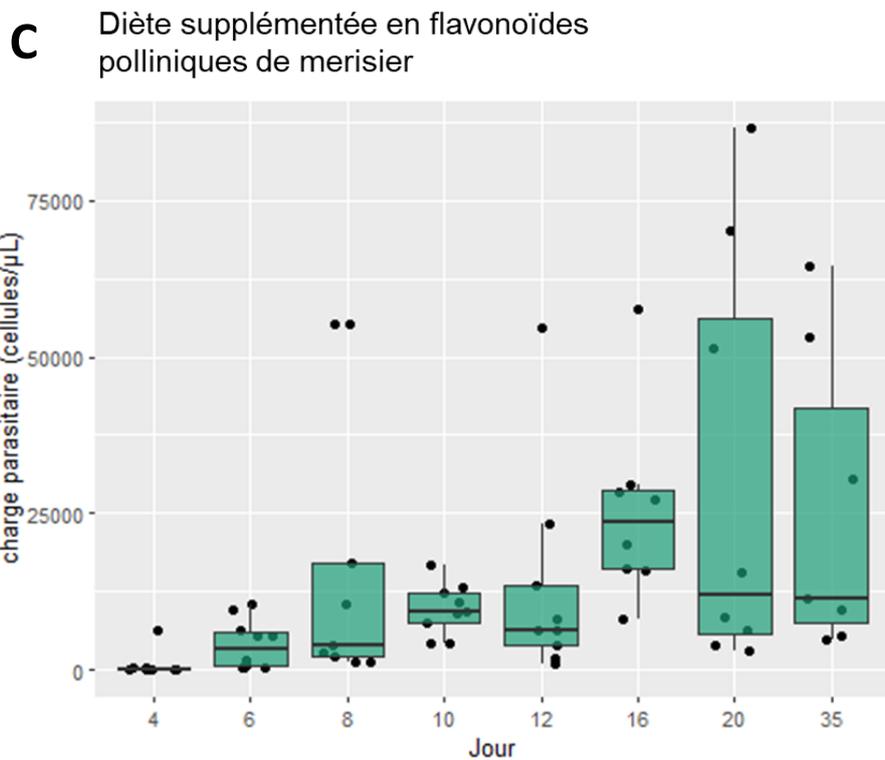
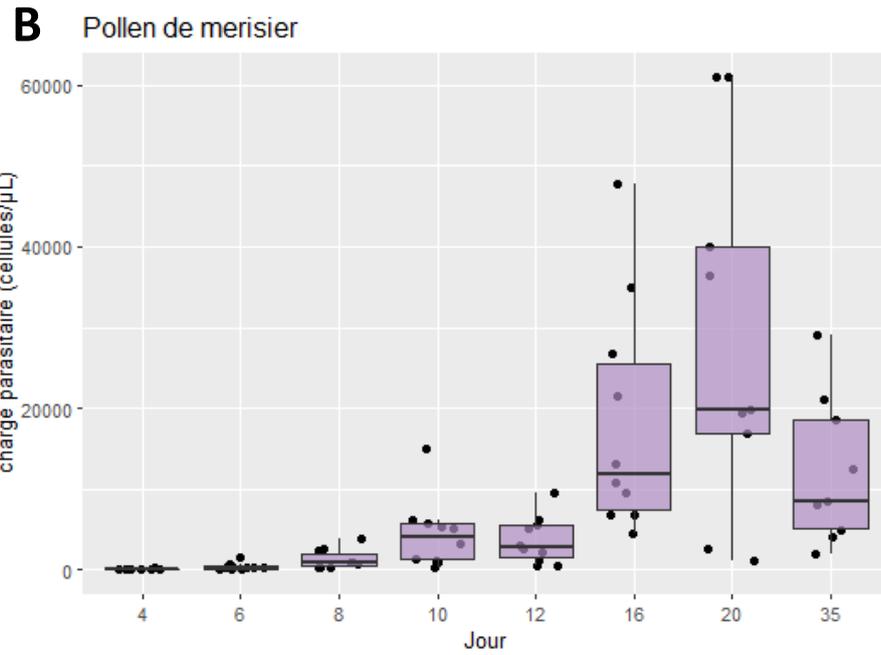
Nom	Tissu	Masse m/z	Composition élémentaire
Quercétine-O-hexoside	Feuilles	463.15	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
Kaempférol-O-dihexosylrhamnoside	Feuilles, corolles, pollen	755.25	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
Quercétine-O-dihexosylrhamnoside	Feuilles, corolles	771.25	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁
Quercétine-O-hexosylrhamnoside	Feuilles, corolles, pollen	609.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
Kaempférol-O-hexosylrhamnoside	Feuilles, corolles, pollen	593.2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅

Rhamnétine-O-dihexoside	Pollen, nectar	639.115	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇
Quercétine-O-hexosylrhamnosylhexoside	Pollen, nectar	771.2	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁
Kaempférol-O-hexosylrhamnosylhexoside	Nectar	755.2	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀
?	Feuilles	447.15	C ₂₂ H ₂₄ O ₁₀

Annexe IV.3 Tableau des molécules autres que flavonoïdes identifiés pour les feuilles, corolles, pollen et nectar. Bien que la quantification des extraits ait été focalisée sur les flavonoïdes, la caractérisation s'est étendue à l'ensemble des métabolites spécialisés présents dans les différents tissus.

Nom	Tissu	Masse m/z	Composition élémentaire
Coumaroylhexose	Feuilles, corolles, pollen	325,1	C ₁₅ H ₁₈ O ₈
Acide coumaroylquinique	Feuilles	337,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₈
Acide caféoylquinique	Feuilles	353,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉
Caféoylhexose	Corolles	341.1	C ₁₅ H ₁₈ O ₉
N,N',N''-tricoumaroyl spermidine	Nectar	582.3	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆
N¹,N¹⁰-dicaféoyl-N⁵-coumaroylspermidine N⁵,N'-dicaféoyl-N''-coumaroylspermidine	Pollen	614,3	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₈
N¹,N⁵,N¹⁰-tricoumaroylspermidine	Pollen	582,3	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆
N¹,N¹⁰-dicoumaroyl-N⁵-caféoylspermidine N⁵,N'-dicoumaroyl-N''-caféoylspermidine	Pollen	598,3	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₇
Féruloyl hexoside	Pollen	355,1	C ₁₆ H ₂₀ O ₉

Annexe IV.4 - Résultats détaillés de l'impact de la diète sur la masse des différents stades de développement. Résultats des analyses statistiques concernant l'impact de la diète sur la masse des



Annexe IV.5 Suivi de la charge parasitaire (cellules de *Crithidia*/ μ L de fèces). Impact des différentes diètes sur la charge parasitaire. Le graphique **A.** représente l'évolution de la charge parasitaire chez les individus soumis au pollen de saule. Le graphique **B.** représente l'évolution de la charge parasitaire chez les individus soumis au pollen de merisier. Le graphique **C.** représente l'évolution de la charge parasitaire chez les individus soumis à la diète de flavonoïdes issus du pollen de merisier. Les boîtes de dispersion, dont les limites représentent l'écart interquartile (IQR), sont entrecoupées par une ligne indiquant la médiane. Les points hors de l'intervalle désigné par les barres verticales s'étendant de part et d'autre de la boîte de dispersion représentent les valeurs extrêmes.